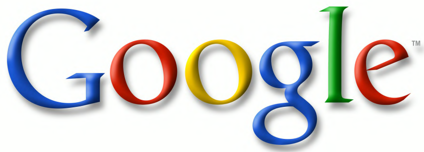

Google





ANNALI
D'IGIENE SPERIMENTALE

PUBBLICATI DAI PROFESSORI

G. BORDONI - UFFREDUZZI (Milano) — P. CANALIS (Genova) — O. CASAGRANDI (Cagliari) — A. CELLI (Roma) — C. FERMI (Sassari) — V. DE GIAXA (Napoli) — E. DI MATTEI (Catania) — A. DI VESTEA (Pisa) — A. MAGGIORA (Modena) — L. MANFREDI (Palermo) — G. ROSTER (Firenze) — G. SANARELLI (Bologna) — F. SANFELICE (Messina) — A. SERAFINI (Padova) — G. SORMANI (Pavia) — G. ZIINO (Messina)

E DIRETTI DAL

PROF. ANGELO CELLI

(Continuazione degli *Annali dell'Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Roma*)

VOLUME XV (NUOVA SERIE) — ANNO 1905
(*con IX tavole*).



UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO — TORINO — ROMA — NAPOLI

1905

INDICE DEL VOLUME XV

Laboratorio siero-vaccinogeno Eritreo

Missione per lo studio delle malattie diffusibili nella Colonia Eritrea

Infezioni protozoarie negli animali domestici in Eritrea

(Piroplasmosi e Tripanosomiasi)

per i dottori **G. MEMMO - F. MARTOGLIO - C. ADANI.**

Lo studio delle infezioni protozoarie negli animali domestici ha un alto interesse scientifico, anche per i suoi rapporti con la patologia umana, e una notevole importanza economica per le sue applicazioni pratiche. I danni che le piroplasmosi e le tripanosomiasi producono negli animali utili sono ben rilevanti: basta pensare quale larga distribuzione geografica abbiano le prime e quale ostacolo alle colonizzazioni rappresentino le seconde. La importanza di queste infezioni è poi aumentata negli ultimi anni, perchè i tripanosomi e i piroplasmi dal campo della patologia veterinaria sono entrati in quello della patologia umana. La febbre gambiense dell'uomo e la malattia del sonno (stadii diversi di una stessa infezione) sono dovute a tripanosomi: secondo le osservazioni di Wilson e Chowring, confermate da Wesbroock, Anderson e altri, la cosidetta febbre delle Montagne Rocciose, o febbre petecchiale, o febbre da zecche, non sarebbe che una piroplasmosi umana. I parassiti trovati da Leishmann (1) e Donovan (2) e poi da altri nella splenomegalia tropicale (Kala-azar) e quelli molto analoghi trovati da Wright nell'ulcera tropicale endemica, non si possono ancora con esattezza classificare; ma piuttosto che pirosomi [come ritengono Laveran e Mesnil (3)], sembra che stieno fra questi e i tripanosomi e costituiscano un nuovo genere *Leishmania* (Ross).

Durante la nostra missione nella Colonia Eritrea per lo studio della peste bovina, abbiamo potuto constatare infezioni da protozoi negli animali domestici. Raggrupperemo le nostre osservazioni in tre paragrafi:

A) Piroplasmosi nei bovini;
B) Piroplasmosi nei cani;
C) Tripanosomiasi.

A) Piroplasmosi nei bovini.

La *piroplasmosi bovina o malaria dei bovini* (Celli) è la più importante di quelle malattie degli animali, che, per le strette rassomiglianze cliniche, per i caratteri morfologici molto vicini dei parassiti, per l'egual modo di trasmissione da insetti appartenenti alle ixodidee, i francesi raggruppano sotto il nome di *piroplasmosi.*

In queste brevi note noi vogliamo sopratutto rilevare i rapporti che corrono tra piroplasmosi e peste bovina.

I diversi autori che hanno studiato la peste bovina nell'Africa Australe hanno segnalato come frequente la presenza di pirosoma nel sangue di animali affetti dalla peste. Ma Nicolle e Adil Bey (4) sono stati i primi a rilevare l'importanza dei rapporti tra le due infezioni durante i loro studi sulla peste bovina in Turchia. La malaria dei bovini è quivi un'affezione molto diffusa, ma d'ordinario latente. A questo riguardo si possono distinguere nettamente gli animali importati dagli animali indigeni: i primi sono talvolta affetti da malaria tipica sotto forma sporadica o epizootica, i secondi non mostrano i segni caratteristici della malaria se non quando sono affetti dalla peste bovina. Gli esami microscopici ripetuti non rilevano la presenza del pirosoma nel sangue di animali sani o all'apparenza tali, mentre al contrario il reperto diviene facile e frequente dopo l'infezione pestosa: quindi nei soggetti indigeni la malaria si può constatare solo nel corso di epizoozie di peste o nelle esperienze di laboratorio.

Dschunkowsky e Luhs (5) nello studiare le piroplasmosi della Russia hanno osservato che animali apparentemente sani, nel cui sangue si potevano constatare scarsi pirosomi puntiformi o anulari, se ammalavano di peste bovina, ammalavano contemporaneamente di piroplasmosi.

Secondo Lingard e Jennings (6) l'emoglobinuria nell'India, dovuta alla presenza del piroplasma, avrebbe fatto la sua comparsa nel bestiame in Bereilly nel 1902, solo dopo le inoculazioni di sangue pestoso per le vaccinazioni.

Noi in un lavoro precedente (7) abbiamo già messo in evidenza i rapporti tra piroplasmosi e peste bovina nella Colonia Eritrea, rapporti che recentemente anche il Koch ha confermato nell'epizoozia di peste, la quale da oltre un anno fa strage nell'Egitto, trovando così una ragione dei poco felici risultati ottenuti colà nelle vaccinazioni.

Come in Europa e in America anche in Africa la malaria dei bovini è largamente diffusa: essa è stata osservata in Algeria, Egitto, Uganda, Kamerun, Colonia del Capo, Est Africa tedesco.

Nella Colonia Eritrea la malattia non è stata rilevata prima d'ora da alcuno: nè il Conti ne fa parola nelle sue notizie sulla peste bovina.

Dalle informazioni avute dai Sigg. Residenti e per le nostre ricerche noi dobbiamo distinguere, riguardo alla malaria dei bovini nella Colonia Eritrea, le regioni fra il litorale e la zona media dalle regioni dell'altipiano. Nelle prime la pioplasmosi sembra regnare enzootica e si manifesta come entità morbosa a sè: nell'altipiano invece la malattia è latente ed è rivelata solo dalla peste bovina.

Ciò può trovare nna spiegazione nel fatto che, delle due razze bovine esistenti in Colonia, l'araba importata predomina lungo la costa, mentre l'abissina predomina sull'altipiano; potrebbe quindi trattarsi di una differente resistenza di razza all'infezione malarica, analogamente a quanto hanno riscontrato Nicolle e Adil Bey in Turchia. Dobbiamo inoltre rilevare che appunto nelle regioni lungo la costa la peste bovina non esiste e quindi la piroplasmosi non è celata dall'infezione pestosa e si rende evidente, mentre sull'altipiano essa si manifesta in genere solo durante le epizoozie di peste e può passare clinicamente del tutto inosservata. La diversa gravità poi della infezione, in rapporto sopratutto all'altitudine, potrebbe far pensare che si tratti di una diversa virulenza o anche di varietà diverse del pirosoma.

Nel Sahel, lungo tutto il litorale e nella zona media, la malaria dei bovini sembra esistere fn dall'epoca dell'occupazione Egiziana. Dagli indigeni è chiamata col nome di *Telàm* (nero), volendo probabilmente indicare il sintoma più evidente e più caratteristico, vale a dire il colore oscuro delle urine. Non abbiamo potuto raccogliere dati epidemiologici certi per difficoltà di luoghi e di mezzi, e non possiamo precisare la mortalità data dall'infezione, perchè le diffidenti popolazioni di quelle regioni sono nomadi e migrano continuamente con il loro bestiame. In ogni modo si può ritenere che l'infezione non sia grave, perchè la mortalità è limitata e che, riguardo alla morbosità, la malattia passi molte volte inosservata agli indigeni. La mancanza delle pioggie sembra sia la causa principale dell'estendersi della piroplasmosi: è durante la stagione della siccità che si accentuano larghe emigrazioni di bestiame in cerca di pascoli migliori; e in quel periodo di tempo i bovini, in condizioni di nutrizione generale meno valide, si affollano attorno alle poche acque perenni. Sembra che gli animali adulti siano più resistenti alla infezione: come altrove si è constatato, la piroplasmosi sarebbe una malattia dell'età giovane dei bovini: le recidive sono miti e le infezioni, le quali decorrono latenti potrebbero dare un certo grado di immunità.

Le nostre osservazioni sono state fatte sull'altipiano, in Asmara,

all'altitudine di 2400 metri. Quivi la malattia è sconosciuta agli indigeni e noi stessi, nelle nostre escursioni in campagna, sopra migliaia di capi di bestiame, non abbiamo riscontrato alcun caso spontaneo della malattia.

Le nostre ricerche sono limitate ad animali durante il corso delle esperienze in laboratorio: abbiamo studiato e seguìto 7 casi, cinque dei quali hanno presentato la piroplasmosi durante lo svolgersi della infezione pestosa, e due durante la vaccinazione contro la peste. Crediamo utile di fare questa distinzione perchè il comportamento clinico e la sintomatologia variano: infatti mentre nel primo caso nessun sintoma malarico esiste e la malattia clinicamente può passare inosservata, nel secondo caso le manifestazioni ben note della malaria bovina sono delle più marcate.

Piroplasmosi e peste bovina. — Dei 5 animali osservati uno si è infettato di peste bovina naturalmente, per coabitazione con malati: gli altri 4 erano bovini che a noi servivano per la conservazione del virus pestoso, e quindi animali di media taglia, giovani (da due a tre anni) e perfettamente sani. Erano stati sottoposti, come di regola, per qualche giorno a metodiche esplorazioni termometriche e a ripetuti esami del sangue, onde potere escludere in essi la presenza di altre infezioni. Gli animali sono stati inoculati sotto cute, come risulta dal protocollo di laboratorio, con sangue di pecora infettata artificialmente con la peste bovina. Possiamo quindi essere certamente sicuri che in questi casi l'inoculazione del virus pestoso non ha per sè stessa trasmessa la piroplasmosi, la quale doveva esser latente.

Il decorso clinico della malattia è stato presso a poco quello della peste bovina: in due casi la morte è avvenuta con qualche giorno di ritardo. Dopo una incubazione di 3-5 giorni, come primo sintoma, è apparsa la elevazione rapida della temperatura: la febbre si è mantenuta continua per 7-9 giorni con remissioni mattutine le quali, a differenza della peste bovina, erano molto più accentuate: è mancata la rapida discesa per crisi sotto al normale, la quale d'ordinario precede di 24-36 ore la morte negli animali pestosi: la temperatura è invece discesa per lisi, ma con oscillazioni molto irregolari, alcune delle quali tornavano a superare i 40°.

Si è svolto del resto il quadro clinico della peste: abbattimento dell'animale che al terzo giorno di febbre cessava dal mangiare e dal ruminare: secrezione muco-purulenta delle congiuntive e della mucosa nasale: lesioni boccali, diarrea, collasso e morte.

A differenza della peste, si possono osservare nella doppia infezione brividi intensi che percorrono e scuotono tutto il corpo, respiro affannoso, accelerato e superficiale, disturbo nel ritmo cardiaco. Negli ultimi giorni in

qualche caso si può rilevare un pallore nelle congiuntive e nella mucosa boccale, sulle quali risaltano le lesioni pestose.

In questi casi non abbiamo mai constatata emissione di urine colorate visibilmente in rosso dall'emoglobina.

All'autopsia si riscontrano le lesioni tipiche della peste bovina. Anche nella piroplasmosi pura si possono avere lesioni che si avvicinano a quelle della peste bovina: Dschunkowsky e Luhs descrivono nella piroplasmosi del Transcaucaso lesioni del 4° stomaco, che ritengono caratteristiche e che si avvicinano molto a quelle della peste.

Nei nostri casi di doppia infezione abbiamo rilevato, oltre le lesioni delle vie digerenti della peste bovina, un pallore delle mucose e dei muscoli; versamento sieroso limpido nel pericardio (raro nella peste bovina); sangue pallido fluido, mentre nella peste si presenta denso, spesso coagulato, di colore scuro. Ma la lesione più caratteristica della doppia infezione e che rileva la piroplasmosi è a carico della milza, la quale è sempre aumentata di volume, di figura ellittica allungata, di colore bleu-acciaio e di consistenza molle: la capsula è distesa e alla superficie di sezione la polpa appare copiosa, ricca di sangue, rosso bruniccia, molle e in qualche parte quasi fluida.

Piroplasmosi e vaccinazione antipestosa. — Nella vaccinazione antipestosa l'animale è sottoposto alla vaccinazione contemporanea di virus pestoso e di siero in proporzioni tali che la reazione sia contenuta entro certi limiti e si determini una immunità attiva. La reazione che segue nei nostri animali vaccinati si limita, nella maggior parte dei casi, a una elevazione di temperatura la quale si mantiene sopra i 40° per 4-6 giorni, per poi discendere al normale.

I due animali da noi osservati, nei quali la piroplasmosi era latente, la vaccinazione ha decorso in primo tempo come in tutti gli altri buoi insieme vaccinati: è apparsa la febbre, senza alcun disturbo a carico dell'apparecchio digerente, senza lesioni boccali, senza diarrea: mentre però negli altri animali la temperatura è discesa al normale dopo 6 giorni, in essi, nei pochi giorni che hanno preceduto la morte (in un caso 3 e in un altro 4), sono comparsi accessi febbrili quotidiani sopra i 41°.

Si è poi svolto il quadro clinico della malaria dei bovini.

Gli animali presentavano notevole prostrazione delle forze e andatura vacillante: avevano brividi fortissimi, specie nel periodo che precedeva l'elevazione della temperatura: il respiro era affannoso, superficiale: il ritmo cardiaco alterato. All'esame obbiettivo non si rilevava nessuna delle lesioni pestose: non lesioni boccali, non lacrimazione, non diarrea: notevoli invece erano il rapido e intenso pallore delle mucose visibili e l'emissione frequente di piccole quantità di urine, fortemente tinte in rosso scuro.

All'autopsia mancavano assolutamente lesioni della peste bovina, si rile-

vava pallore estremo delle mucose e dei tessuti sottocutanei. La milza appariva raddoppiata di volume, rammollita: la capsula distesa si lacerava con estrema facilità: il connettivo trabecolare era difficilmente riconoscibile e i follicoli apparivano isolati come punticini bianchi. Nel cuore si notava il miocardio pallido, qualche emorragia sotto-endocardica: il sangue era pallido, fluido, acquoso. Nessun'altra lesione apprezzabile macroscopicamente negli organi interni.

I pezzi destinati all'esame microscopico sono stati fissati in alcool assoluto, inclusi in paraffina, sezionati e colorati con emallume, ematossilina ed eosina (*).

Le *glandole linfatiche* presentano un'iperplasia dei follicoli, i quali in alcuni punti della periferia appaiono fusi tra loro: nell'interno dei follicoli si notano accumuli di cellule cariche di emosiderina.

Il *fegato* conserva la sua struttura normale, è povero di sangue; le cellule epatiche di figura poligonale hanno il protoplasma di aspetto polverulento con nuclei pallidamente colorati.

La struttura istologica della *milza* non è più riconoscibile; il reticolo è appena visibile e gli elementi cellulari della polpa appaiono dissociati da una enorme quantità di sangue che infiltra tutto l'organo. Si riscontrano alterazioni regressive di vario grado negli elementi cellulari e si rileva la presenza di numerose cellule cariche di emosiderina.

Nei *reni* alcuni glomeruli si presentano di aspetto normale; la maggior parte però appaiono alterati. Notasi generalmente un aumento della cavità glomerulare, la quale spesso si presenta ripiena di un detritus amorfo, colorato dall'eosina: le cellule epiteliali di rivestimento dei glomeruli sono di aspetto normale. Taluni dei glomeruli presentano un anmento dei nuclei delle anse vascolari, altri si mostrano in uno stato avanzato di atrofia. Gli epitelii dei tubuli contorti, specialmente nella sostanza corticale, si presentano notevolmente alterati; i limiti fra le cellule epiteliali non sono più riconoscibili; la parte interna di esse, disfatta, riempie in forma di detritus il lume del tubo. Alcune delle cellule presentano il nucleo pallidamente colorato; in altre cellule il nucleo è del tutto scomparso.

Nella sostanza corticale si rinvengono qua e là piccole chiazze di infiltrazione parvicellulare, specialmente perivasali.

I tubuli retti presentano piccole zone circoscritte di infiltrazione calcarea.

Negli *altri organi* esaminati non si riscontrano alterazioni degne di nota.

Esame del sangue. Descrizoine del parassta. — Il sangue per gli esami microscopici era preso dall'orecchio degli animali malati o dagli organi interni nelle autopsie ed osservato sia a fresco sia in preparati colorati con il bleu di metilene boracico o col metodo Romanowski, Giemsa, ecc. Come abbiamo già detto, ripetuti esami microscopici prima dell'inoculazione con virus pestoso non avevano rivelato la presenza del piroplasma nel sangue periferico degli

(*) Le ricerche microscopiche sono state eseguite nell'Istituto di anatomia patologica, diretto dal prof. Marchiafava, con l'aiuto del dott. Nazari.

animali, che si mostravano apparentemente sani. Il parassita è comparso nel sangue al 4°-6° giorno della malattia: ma nei casi di piroplasmosi e peste il reperto non è stato mai abbondante nè costante, occorrendo spesso l'esame di più preparati per trovare qualche forma parassitaria, mentre nei casi di piroplasmosi dopo la vaccinazione, il reperto è stato talora ricchissimo, e in un caso, nelle 24 ore che precedettero la morte, ben pochi erano i corpuscoli sanguigni privi di parassiti. In tutti i casi poi, reperto positivo e facile si è avuto dalla milza e dal midollo osseo.

Noi dividiamo le forme osservate in due gruppi:

1° Forme rotonde;

2° Forme a pera.

Forme rotonde. — Delle forme rotonde distinguiamo forme piccole e forme grandi, distinzione che ha valore anche perchè mentre le prime si trovano generalmente a due entro lo stesso globulo, le seconde invece sono costantemente uniche.

Le forme rotonde piccole (fig. 1-4) appaiono alle colorazioni differenziali costituite talora da un piccolo ammassolino di cromatina, attorno al quale si stenta a riconoscere un lieve straterello di protoplasma (fig. 1). In altre la massa protoplasmatica è più sviluppata: tutto il parassita rotondeggiante è colorato uniformemente in bleu e presenta il blocchetto di cromatina collocato eccentricamente vicino al margine (fig. 2). In altre forme infine (fig. 3-4) il parassita assume un aspetto anulare in modo da ricórdare perfettamente le forme anulari della malaria umana: la massa protoplasmatica è addensata verso il polo più ottuso dell'anello e collegata mediante due sottili fili di protoplasma al blocchetto di cromatina.

Le forme rotonde più grandi (fig. 5-8) sono sempre isolate, una per emazia; sono perfettamente sferiche e collocate quasi al centro del globulo rosso. La parte centrale del parassita è perfettamente incolora e il protoplasma colorato appare come un sottile straterello lungo la periferia: la cromatina è disposta sull'orlo o riunita come un rigonfiamento a falciuola della periferia o divisa e distribuita irregolarmente in forma di granulini isolati di varia grandezza. Abbiamo riscontrato in un preparato una forma allungata a biscotto, nella quale la cromatina era divisa in 6 ammassi disposti regolarmente alla periferia: la forma era ricca di protoplasma (fig. 8).

Forma a pera. — Le forme a pera (fig. 9-12) si possono trovare anche libere nel plasma. Nell'interno dei globuli rossi esse o sono

isolate o a due nello stesso globulo, assumendo l'aspetto caratteristico del *pirosoma bigeminum*. I parassiti piriformi raggiungono talora per grandezza quasi l'intero diametro del globulo rosso. Le forme doppie talvolta disposte ad angolo acuto tra loro, sembrano riunite per l'estremo aguzzo da un filo protoplasmatico; altre volte invece sono isolate e disposte parallelamente fra loro.

Abbiamo potuto rilevare due stadii del parassita che riteniamo importanti: in uno (fig. 10) i due corpi piriformi molto ravvicinati fra loro sono riuniti e fusi per il loro estremo aguzzo: nell'altro (fig. 11) la fusione dei due corpi piriformi è ancora maggiore, tanto che il parassita appare unico, assumendo un aspetto di cuore: vi è però nettamente accennata nel protoplasma una separazione verso la base. Le due masse cromatiche sono nel secondo caso più ravvicinate fra loro.

La maggior parte delle forme osservate presentano all'esame a fresco sia dei movimenti di traslazione entro il globulo rosso, sia dei movimenti ameboidi più o meno vivaci: i primi si verificano sopratutto nelle forme piccole rotonde; le forme grandi rotonde per lo più appaiono immobili.

Ricorderemo infine come nei preparati a colorazione semplice abbiamo talora riscontrato globuli rossi, di grandezza un po' maggiore del normale, tempestati di minuti granuli colorati in azzurro. Queste forme si possono osservare anche nella malaria umana e le abbiamo riscontrate anche in altre forme di anemia dei bovini, nella tripanosomiasi, ecc. Secondo lo Smith sarebbero forme immature o embrionali, forme di protoplasma imperfettamente convertito nel discoplasma del corpuscolo rosso adulto: Dionisi ha trovato lo stesso reperto in forme di sangue di feto: si debbono quindi interpretare come alterazioni dei globuli rossi neoformati.

Quali siano ora i rapporti fra le varie forme osservate del parassita e se si tratti di diverse fasi di sviluppo di un solo parassita, non possiamo affermare con certezza.

In generale tutte le forme descritte si possono riscontrare vicine l'una all'altra nel sangue periferico.

Le forme rotondeggianti piccole sono certamente delle forme iniziali del parassita. La forma 1, per esempio, ricorda perfettamente i corpicciuoli che Lignières (18) chiama *corpuscoli germi*, vale a dire corpicciuoli molto piccoli, colorati come la cromatina, i quali deriverebbero dalla divisione della sostanza cromatica di un parassita adulto. Secondo Lignières dal corpuscolo germe deriverebbero due varietà di corpuscoli: quelli pieni, colorati uniforme-

mente, come per esempio fig. 2, e quelli che hanno una zona chiara, come per esempio fig. 3. Il Lignières crede che probabilmente queste due forme non abbiano qualità identiche: gli elementi provvisti di una zona chiara rappresenterebbero la prima evoluzione del corpuscolo germe verso il giovane ematozoario rotondo, mentre gli elementi pieni e fortemente colorati continuerebbero a moltiplicarsi per scissiparità, rappresentando la vera forma di moltiplicazione.

Le forme rotonde grandi, secondo lo Smith, si riscontrano nei casi cronici della malattia. Noi le abbiamo riscontrate, anche all'infuori degli attacchi di piroplasmosi acuta, in animali che sembravano apparentemente sani.

Le forme piriformi, secondo Doflein, corrisponderebbero alle semilune della malaria umana: esse si trasformerebbero in sfere e si distinguerebbero in macrogameti e microgametociti, i quali nell'intestino della zecca divenuti maturi compirebbero le fasi della fecondazione. Secondo Lignières invece, la forma piriforme si tramuterebbe in forma rotonda, dalla cui cromatina deriverebbero poi i corpuscoli germi.

Noi abbiamo riscontrato le forme a pera abbondanti negli attacchi di piroplasmosi acuta. Le figure 10 e 11 sono state da noi rilevate in preparati colorati: la disposizione delle masse cromatiche e l'aspetto del protoplasma porterebbe ad ammettere che si possa verificare la fusione di due parassiti piriformi in uno solo, avverandosi così una coniugazione delle due forme parassitarie. Se così avvenisse, si potrebbero legare fra loro le tre serie di forme che noi abbiamo distinto nei parassiti, anche in base alle osservazioni nostre sulla piroplasmosi canina.

Le forme rotonde e piccole sarebbero la fase iniziale del parassita, i corpuscoli germi del Lignières, e, sviluppandosi, esse darebbero luogo alle forme piriformi, stadio adulto e forse differenziato del parassita. I parassiti piriformi si potrebbero riunire per coniugazione entro lo stesso globulo in una forma piriforme unica, la quale si tramuterebbe poi in una forma rotonda grande, trasformazione questa già constatata e ammessa da Celli e Lignières. La forma rotonda e grande per divisione della cromatina (come appare evidente nella fig. 8 e fig. 13) darebbe di nuovo i corpuscoli germi del Lignières, le fasi iniziali del piroplasma.

Le osservazioni da noi fatte non sono sufficienti per affermare con certezza questo ciclo; ricorderemo tuttavia come le forme piriformi appaiano negli attacchi di piroplasmosi acuta e come le forme

rotonde grandi si riscontrino, secondo lo Smith, nelle forme croniche della malattia. Potrebbero quindi queste forme rotonde, come più resistenti perchè derivate dalla coniugazione di due individui. mantenere a lungo l'infezione latente nell'organismo animale e produrre una nuova generazione di parassiti sotto certe date condizioni, quali per esempio altre infezioni, peste bovina, ecc.

Quali forme poi siano capaci di trasmettere l'infezione attraverso le zecche, noi non sapremmo dire.

Secondo Lignières, le forme resistenti del piroplasma, che passerebbero poi nelle zecche, sarebbero i *corpuscoli germi* stessi.

Il Bowhill (9) nella « Rhodesian Fever » avrebbe osservato una forma flagellata del piroplasma bovis: il parassita presenterebbe una porzione allargata e allungata che si proseguirebbe in un delicato flagello ondulato, sul quale, ad attento esame, si vedrebbero due piccole protuberanze.

***

Un'altra questione si affaccia oggigiorno nello studio della piroplasmosi, stabilire cioè di quale forma di parassiti si tratti, perchè si deve ammettere oramai una *molteplicità di parassiti nella piroplasmosi bovina.*

Infatti il Lignières nel 1898 distingueva nella Repubblica Argentina due forme di piroplasmosi (tristeza): una forma tipica e una forma atipica; e nel 1900, in un primo tentativo di studio comparato sulla piroplasmosi bovina, dimostrava sperimentalmente che animali vaccinati contro la malattia riscontrata in Francia non lo erano affatto contro uno dei parassiti riscontrati nella Repubblica Argentina.

Il Sajò (10) ammette che i bovini del Texas, i quali nel Texas stesso non ammalano perchè già in giovanissima età hanno acquistato un alto grado di immunità rispetto ai parassiti quivi endemici, possono essere infettati dalle zecche degli Stati della Luigiana e del Missisipì.

Nel suo lavoro sulla piroplasmosi bovina il Lignières, proseguendo i suoi studi nella Repubblica Argentina, ammette più varietà di parassiti. Così un parassita *A*, dopo 5-7 giorni di incubazione, determina regolarmente la infezione con ipertermia, anemia estremamente grave e rapida, emissione di urine rosse, decorso breve (5-8 giorni) e mortalità del 50 °/₀. Il parassita appare nel sangue periferico fin dall'inizio del male: e si presenta sotto forma di numerosi pirosomi fusiformi e bigemini nei globuli.

Un altro piroplasma *C* mostra qualità nettamente distinte. Il periodo di incubazione è maggiore, la durata della malattia è più lunga, fino a tre settimane, con decorso talora insidioso; la mortalità è dell'80 °/₀. La ipertermia è sempre molto accentuata, ma l'apparizione dell'emoglobina nelle urine è affatto rara o si produce solo all'avvicinarsi della morte; non si

constata anemia rapida e grave. I parassiti sono piccolissimi e più spesso sferici.

Gli animali vaccinati contro la forma *A* del parassita, prendono una forma mortale se inoculati poi con la forma *C*: gli animali vaccinati contro la forma *C*, lo sono pure contro la forma *A*. Il Lignières ha veduto queste due varietà di parassiti conservare i loro caratteri distinti per oltre due anni.

In una lettera a Lignières (24 gennaio 1903) Theiler riferisce dal Transval che si distinguono in quel paese due specie di piroplasmosi bovina, le quali si presentano costantemente sotto caratteri differenti. La Redwater del Transvaal è determinata da un pirosoma bigeminum classico e produce un'affezione uguale a quella data dal parassita tipo A di Lignières. L'altra forma di piroplasmosi, la quale proviene dalla costa Est, ha già infierito nel bestiame della Rhodesia, ove è stata rilevata dal Koch nel 1898 e più tardi studiata da Gray e Robertson (1902): attacca ora il Transvaal ed è prodotta da parassiti piccolissimi, i quali prendono spesso quell'aspetto bacillare, già osservato dal Celli nella malaria dei bovini dell'Agro Romano. Gli animali vaccinati contro la Redwater ordinariamente non resistono e soccombono all'infezione con queste forme di parassiti.

Dschunkowsky e Luhs studiando le piroplasmosi della Russia distinguono tre forme:

1° piroplasmosi della Russia del Nord;

2° piroplasmosi del Ciscaucaso;

3° piroplasmosi del Transcaucaso.

Mentre le due prime forme sono molto vicine fra loro, la piroplasmosi del Transcaucaso se ne differenzia fortemente sia per il quadro clinico, sia per il reperto anatomo-patologico, sia per il reperto parassitario.

La piroplasmosi dei paesi nordici russi è caratterizzata dalla comparsa delle tipiche forme a pera nel sangue: e lo stesso reperto si avrebbe nella forma del Ciscaucaso nella quale però i parassiti avrebbero una grandezza maggiore.

Nella piroplasmosi del Transcaucaso o, come gli autori la chiamano, piroplasmosi tropicale si possono osservare tre forme di parassiti.

1° Forme bacillari, le quali o si presentano sotto forma di bastoncini di eguale spessore con estremi arrotondati oppure con un rigonfiamento nel centro e un estremo solo rigonfiato, o si presentano come sottili forme a virgola con un estremo affilato e l'altro rotondo.

2° Forme anulari, le quali deriverebbero dalle forme bacillar.

3° Forme puntiformi o rotonde o lievemente ovalari.

Le due prime forme di parassiti si riscontrerebbero nella piroplasmosi tropicale acuta: le forme puntiformi nella piroplasmosi cachettica.

Recentemente il Koch nell'Egitto ha riscontrato associata alla peste bovina una forma di piroplasmosi i cui parassiti sarebbero molto simili a quelli trovati nella febbre della costa d'Africa. Ma e parassiti e sintomi della malattia sembrano molto più in rapporto con la forma di piroplasmosi tropicale descritta da Dschunkowsky e Luhs nel Transcaucaso.

Finalmente, in una prima relazione sulla malaria degli animali in Kamerun, lo Ziemann (11) riferisce che nei bovini nativi la malaria è relativamente accidentale, perchè gli animali acquistano un alto grado di immunità

nella giovinezza: e nello svolgersi della malattia non si ha mai come sintoma la emoglobinuria. I parassiti di questa piroplasmosi si presentano sotto forma di piccolissimi punti vivacemente mobili: le forme più grandi sono per lo più rotondeggianti, ovalari e anche anulari: una sola volta lo Ziemann avrebbe trovato le tipiche forme a pera.

Nei casi da noi esaminati non abbiamo riscontrato le forme bacillari del parassita: e la piroplasmosi da noi osservata sull'altipiano in Eritrea si potrebbe ravvicinare alla piroplasmosi data dal parassita tipo *A* di Lignières, alla Redwater, alle piroplasmosi dell'Italia, della Francia, della Germania, del Nord della Russia, con le differenze già notate dal Kossel (12) per la Redwater, vale a dire che le forme a pera isolate o doppie sarebbero più grandi nei rapporti con il globulo rosso. È tuttavia difficile, come osserva il Kossel, dare un giudizio su queste differenze morfologiche, se non si ha l'opportunità di eseguire le stesse ricerche nei diversi luoghi con gli stessi metodi.

Quanto alle *zecche* trasmettitrici della piroplasmosi bovina, ricorderemo come la specie *Rhipicephalus annulatus* (Say) sia stata provata quale causa della trasmissione della malattia da Smith e Kilborne — specie identica, secondo il Neumann, all'*Ixodes bovis* (Riley) e al *Boophilus bovis* (Curtice). Questa specie occorre in America (in larga area degli Stati Uniti, nelle Indie occidentali, Repubblica Argentina Venezuela, Uraguay e forse anche nel Brasile), come pure in molte parti dell'Africa e dell'Asia e nell'Australia.

L'*Ixodes reduvius* sembra abbia eguale importanza nell'Europa, dove è largamente distribuito.

La « Redwater » della Rhodesia sembra sia trasmessa dal *Rhipicephalus Shipley*, specie descritta dal Neumann nel 1903: secondo Lounsbury anche dal *Rh. appendiculatus*.

Le specie di zecche da noi riscontrate in Eritrea sugli animali ammalati vennero classificate dal Neumann, e sono:

Rhipicephalus annulatus.
Rhipicephalus pulchellus.
Amblyomma variegatum.

B) Piroplasmosi canina.

Abbiamo avuto occasione di esaminare dal maggio 1903 al febbraio 1904 parecchi casi di una malattia, talora acuta, talora cronica, nei cani, caratterizzata principalmente da febbre e da anemia rapida e profonda. Il decorso clinico, l'esame microscopico del sangue, il reperto anatomo-patologico ci hanno dimostrato che la malattia è dovuta a una infezione del globulo rosso da un protozoo del genere *piroplasma*.

Questa malaria dei cani è stata in patologia veterinaria designata con vari nomi, i quali si riferiscono quasi sempre ai principali sintomi di essa: in Francia *ittero infettivo*, nel Sud Africa *hondziekte*, *itterizia maligna*, *febbre biliosa* del cane, *malaria maligna*. Il Nuttall (13), al quale dobbiamo il più recente e accurato lavoro sull'argomento e dal quale desumiamo i dati, preferisce denominarla *piroplasmosi canina*.

È bene distinguere, come dice il Nuttall, le osservazioni fatte in Europa e in Africa, per la ragione che i parassiti cagionanti le piroplasmosi degli animali sembrano appartenere a specie differenti nelle diverse località.

In *Europa*, i primi ad osservare la malattia sono stati Piana e Galli Valerio in Italia nel 1895. Essi trovarono il parassita nell'esame del sangue di un pointer-bracco il quale, dopo essere stato a cacciare in marcite di località malarica, si era ammalato con febbre, anoressia, debolezza, ittero, e presentava emissione di urine ricche di emoglobina. Il protozoo aveva la maggiore affinità con quello descritto da Smith e Kilborne nella febbre del Texas, epperò gli osservatori proposero di chiamarlo *pirosoma bigeminum v. canis*.

Celli riferisce che nella campagna romana si sono osservati dei cani bracchi, venuti dalla Lombardia, contrarre una simile infezione.

In *Francia* la malattia fu per la prima volta ricordata da Leblanc di Lione (1900), il quale in cani da caccia, malati di ittero infettivo, trovò nell'interno dei globuli rossi, e anche liberi nel plasma, numerosi parassiti simili al piroplasma del bue e della pecora. La sua comunicazione è molto breve ma chiara, come dice il Nuttall, e non merita affatto l'osservazione di Nocard che la decrizione del parassita sia poco esatta. Successivamente, dopo le ricerche di Marchoux, Leblanc dice di aver riscontrato in altri quattro cani i parassiti corrispondenti alla descrizione datane da Marchoux.

Notevole contributo alla conoscenza della malattia in Francia hanno portato i lavori di Nocard e Almy nel 1901 e quello importante di Nocard e Motas nel 1902.

Nell'*India* riferisce un caso di malaria canina il Dalgetty con reperto positivo nel sangue.

La piroplasmosi canina nel *Sud Africa* è stata riconosciuta come una malattia distinta per la prima volta da Hutcheon nel 1893. Egli rilevò la distruzione dei globuli rossi e l'emoglobinuria e si fermò sulla stretta rassomiglianza tra la malattia dei cani e l'emoglobinuria dei bovini.

Tanto l'Hutcheon nel 1899 che il Robertson nel 1901 convengono, nei loro lavori, che il dott. Carrington Purvis dell'Istituto di batteriologia di Grahamstown è stato il primo in Africa a descrivere il piroplasma nel sangue di cani malati di questa malattia. Sembra che poco prima, nel 1898, il Koch avesse veduti simili parassiti nell'Est Africa tedesca. Nel suo rapporto da Daressalam, Koch nota incidentalmente come avesse trovato in un cane parassiti simili a quelli della malaria: e notizie riferite al Nuttall da Kolle e Kossel confermano che il parassita trovato dal Koch era il piroplasma canis. A quel rapporto probabilmente, scrive il Nuttall, si riferisce il Martini, quando dice che Koch osservò il parassita nel Transvaal nel 1897. Inoltre il Martini aggiunge (senza citare la fonte) che il Bitter del Cairo avrebbe osservato i parassiti nei cani dell'Egitto: ma il Nuttal non è riuscito a controllare l'affermazione.

Nel *Senegal* la malattia è stata osservata da Marchoux, il quale ha trovato i parassiti nel sangue di 11 cani che avevano una forma apparentemente mite della malattia. Uno dei casi di Almy, in Francia, sembra che derivasse da Tunisi.

Nell'Eritrea la malattia per lunghi anni è stata chiamata *anemia dei cani*, richiamando con questo nome semplicemente il sintoma più evidente del quadro morboso. Varie ipotesi erano state emesse sulla sua possibile natura; e fra esse predominava l'idea che la malattia fosse dovuta alla presenza di elminti intestinali.

Sembra che la malattia non sia diffusa in tutta la colonia: noi l'abbiamo potuto constatare nella zona intermedia di Ghinda e sull'altipiano a 2400 metri in cani, i quali certamente non si erano mai allontanati da Asmara. È stato anche osservato che cani, i quali a Ghinda non avevano avuta alcuna manifestazione apparente della malattia, appena trasportati sull'altipiano, hanno presentato la piroplasmosi sotto forma acuta. Questa osservazione coincide con quella che si verifica per la malaria dell'uomo in Eritrea: molti individui, i quali nelle località malariche da cui provengono non hanno avuta manifestazione febbrile alcuna, al venire sull'altipiano non malarico, sono presi quasi costantemente da accessi febbrili.

Nel Sud Africa la malattia sembra limitata a certe località. L'Hutcheon riferisce che essa è molto comune nelle città e nei distretti della costa, ma è relativamente rara nelle parti elevate della colonia.

Tutte le *razze* di cani sembrano soggette alla piroplasmosi. I cani da caccia sono maggiormente predisposti, anche perchè più facilmente esposti all'infezione. Secondo Hutcheon, i cani importati e le

razze più fine sono più suscettive dei cani di una razza della colonia del Capo: ma secondo Robertson la malattia attaccherebbe indifferentemente e la razza del Capo e i cani importati. Nell'Eritrea i cani da caccia importati dall'Italia difficilmente sfuggono all'infezione: i cani di Cassala (in casi da noi osservati sull'altipiano) sono pur essi molto sensibili: nei cani randagi abissini la malattia passa forse inosservata o decorre in modo molto benigno: certamente gli indigeni non la riconoscono.

L'età ha influenza sulla predisposizione alla malattia: a noi risulta che i cani giovani sono molto più sensibili.

Mentre gli autori francesi ammettono questa maggiore suscettività, gli osservatori del Sud Africa non ne fanno parola.

Il Nocard dice che nei casi sospetti con reperto parassitario negativo nel sangue, se si inocula il sangue dell'animale sospetto in un cane giovanissimo, si produce spesso in questo una malattia acuta, mortale, con ricco reperto parassitario nel sangue.

Riguardo alla *influenza delle stagioni* le osservazioni sono scarse: secondo Robertson la malattia nel Capo prevale sopratutto nell'estate e nell'autunno: i casi di Piana e Galli Valerio in Italia furono osservati in aprile: in Francia nel settembre e nell'ottobre. Nella Eritrea noi abbiamo osservato casi in tutte le stagioni: più frequenti però e più gravi avemmo occasione di osservarne dal maggio al settembre, specialmente dopo la stagione delle pioggie.

È difficile poter precisare la durata dell'*incubazione* della malattia nell'infezione naturale.

In un caso citato da Lounsbury e Robertson un piccolo cane pointer rimasto sempre in casa in Cape Town, portato per la prima volta a caccia, ammalò dopo 10 giorni. In Francia, Almy avrebbe osservato nell'infezione spontanea un'incubazione di 10 giorni in due casi, di alcune settimane in un caso e incerta in altri.

Più esatte sono le osservazioni nelle infezioni sperimentali. Qualunque sia la quantità di sangue infetto inoculato, la ricchezza sua in parassiti e il modo di inoculazione, passa sempre un certo tempo prima della comparsa dei primi sintomi. Questo periodo di incubazione varia secondo la via di inoculazione seguita. È più breve nell'inoculazione endovenosa: secondo Spreull e Robertson sarebbe di 3-4 giorni; secondo Nocard e Motas i parassiti non compaiono nel sangue mai prima della 36ª ora, in regola generale dopo 2 giorni. Nell'inoculazione sottocutanea o intramuscolare Nocard e Motas ammettono l'incubazione da 5-7 giorni. Robertson avrebbe osservato il manifestarsi della malattia anche al terzo giorno.

La malattia presenta nei cani *decorso acuto*, *subacuto* o *cronico*.

Nei casi *acuti* la durata della malattia è di 6-7 giorni. La temperatura si mantiene sempre elevata, oscillando tra 40°-41°, con remissioni mattutine poco

accentuate e discende sotto il normale prima della morte. L'animale appare subito abbattuto; rifiuta il cibo, presenta frequentemente vomito di materie mucose in primo tempo e poi biliose. La debolezza muscolare aumenta sempre più: il cammino è impacciato e in seguito si manifesta paresi o paraplegia. Il respiro è accelerato, irregolare, superficiale; il polso rapido; la sensibilità generale e specifica si attutisce rapidamente. Le mucose visibili divengono pallidissime e talora fortemente itteriche; l'emoglobinuria non è sempre presente. L'animale muore in coma.

Nei casi *subacuti* la durata della malattia è da 15-20 giorni. La temperatura oscilla tra 39°-40°.5; in qualche caso abbiamo potuto rilevare le elevazioni di temperatura riunite regolarmente in periodi febbrili di 48 ore; la temperatura sale nelle prime 24 ore e poi si abbassa lentamente per discendere al minimo, senza però arrivare mai al normale.

La sintomatologia è come nei casi acuti, ma le manifestazioni morbose sono un po' meno accentuate. Vi è anoressia, il vomito non sempre; prostrazione di forze, anemia rapida e profonda, talora emoglobinuria. Qualche volta si possono avere disturbi intestinali, ma non sono frequenti. La morte non è l'esito costante della malattia.

Nella forma *cronica*, dopo un primo periodo febbrile, la temperatura si mantiene sempre normale, presentando ogni tanto o delle elevazioni serotine di 40°, o periodi febbrili di qualche giorno. L'anemia è il sintoma principale: le mucose visibili sono pallide, vi è debolezza muscolare, anoressia, dimagramento. Non abbiamo riscontrato in questi casi emoglobina nelle urine. La forma cronica può durare da 3-6 settimane.

In questa forma appaiono facili le complicazioni per lo stato di denutrizione generale del cane e per la deficiente e scarsa irrorazione sanguigna dei tessuti. Così in un caso abbiamo veduto manifestarsi un'ulcera fagedenica del labbro inferiore; in un altro caso abbiamo osservato frequenti e copiose epistassi.

Tanto nel sud-Africa che in Francia è stato osservato che dopo un attacco della malattia segue una certa *immunità*: secondo Lounsbury tale immunità sarebbe transitoria: Nocard e Motas l'avrebbero riscontrata anche dopo sei mesi. Nell'Eritrea le recidive, se non frequenti, pure si verificano: in un caso abbiamo osservato una recidiva dopo tre mesi. E degno di nota, come osserva il Nuttall, che i cani « salted » nel sud-Africa conservano i parassiti del sangue ancora più mesi dopo l'apparente guarigione, come dimostra l'inoculazione positiva del loro sangue in animali nuovi. Robertson ha trovato che il sangue di un animale « salted », il quale non presentava parassiti all'esame microscopico, è stato capace di dare l'infezione ad un cane nuovo.

Il Nuttall ha riunito in due tabelle comparative i sintomi della piroplasmosi canina come si presenta nel sud-Africa e in Francia. Sebbene la malattia appaia in pratica la medesima, il Nuttall crede tuttavia prematuro affermare che le due forme siano identiche. La

differenza nel quadro clinico consisterebbe nella presenza costante di febbre, vomito, anoressia, ittero ed emoglobinuria nella piroplasmosi africana, mentre questi sintomi per lo più mancherebbero nella piroplasmosi europea.

Per quanto risulta dalle nostre osservazioni, noi potremmo distinguere i cani di Cassala da quelli italiani importati. Infatti nei primi si riscontra tutto il quadro e la fenomenologia clinica data dal Nuttall per la piroplasmosi del sud-Africa, mentre nei cani italiani si verifica più spesso il quadro clinico della piroplasmosi descritta in Francia da Nocard e Motas. Se questo si debba a due diverse varietà di piroplasmosi o a differente resistenza delle due varietà di cani, non potremmo per ora decidere. Il Nuttall raffronta anche il reperto anatomo-patologico nelle due piroplasmosi: in rapporto con la maggiore gravezza dei sintomi sono più accentuate le lesioni, specialmente a carico delle vie digerenti, nella piroplasmosi del sud-Africa.

Riferiamo l'autopsia di due cani di Cassala morti di piroplasmosi acuta (n. 100–101 di protocollo di laboratorio).

Notevole dimagramento: mucose visibili pallidissime con tinta subitterica: nessuna alterazione macroscopica nel sistema linfatico. Nel cavo peritoneale si riscontra abbondante liquido citrino: la milza è notevolmente ingrandita, di colore oscuro e rammollita: il fegato, aumentato di volume, ricorda l'aspetto che ha il fegato nell'atrofia giallo-acuta. Lo stomaco è ricoperto di abbondante catarro: vi è lieve infiammazione della mucosa gastrica: l'intestino tenue, coperto di muco viscido, presenta infiammazione catarrale più o meno diffusa. I reni sono congesti in un caso: la capsula si distacca facilmente e sulla superficie si osservano numerose emorragie di varie dimensioni: nell'altro caso si presentano pallidi al taglio e non fanno riconoscere la distinzione tra la sostanza midollare e la corticale. Scarso liquido sieroso (siero sanguinolento in un caso) nelle pleure e nel pericardio: emorragie sotto-endocardiche: il sangue è fluido, acquoso. I polmoni appaiono anemici. Nella vescica vi è urina torbida, rosso-scura: l'esame chimico microscopico dimostra presenza di albumina, di emoglobina e di pigmenti biliari: cellule vescicali e renali tinte in giallo.

All'esame microscopico delle sezioni degli organi, colorate con i vari metodi di colorazione (emallume; ematossilina-eosina, ecc.), abbiamo potuto osservare le seguenti alterazioni:

Nelle *glandole linfatiche* si rileva una iperplasia degli elementi linfatici.

Nel *fegato* si notano lesioni parenchimatose di natura necrotica con infiltrazione parvicellulare grave, diffusa nel tessuto connettivo interstiziale.

La *milza* presenta i caratteri del tumore acuto. Si nota iperplasia degli elementi della polpa, ricchissima di sangue, con gravi emorragie nel parenchima splenico, prevalentemente sotto-capsulari.

I *reni* mostrano notevoli alterazioni parenchimatose e necrosi degli epitelii dei tubuli contorti.

Nei *polmoni* abbiamo riscontrato in un caso bronco-polmonite essudativa e desquamativa.

Esame del sangue — Descrizione del parassita. — Nel sangue periferico la presenza dei parassiti non è costante: in generale essi sono sempre molto scarsi, tanto che qualche volta, specie nei casi cronici, bisogna insistere più giorni per poter rilevare rare forme parassitarie. In un cane affetto da piroplasmosi acuta abbiamo potuto osservare un reperto abbondantissimo 24 ore prima della morte.

Costante invece e ricco è il reperto parassitario nel sangue del midollo delle ossa e della milza.

Piana e Galli Valerio descrivono il parassita come un corpicciuolo piriforme, incoloro, con un piccolo nucleo rotondo od ovale nella parte più allargata. Nel maggior numero dei globuli infetti il parassita si presentava a due, e le due forme erano ravvicinate per le loro estremità assottigliate: in qualche emazia i parassiti erano riuniti fino a 5.

Nella piroplasmosi in Francia, secondo Nocard e Motas, il parassita è abbondante nel sangue periferico nelle forme rapide. La maggior parte dei globuli infetti contiene un solo parassita e di forma rotonda: si possono riscontrare però emazie con un numero maggiore di parassiti, fino a 16, più piccoli, irregolari, poliedrici e raramente a pera.

I globuli infetti sono aumentati di volume e più pallidi degli altri.

Il parassita presenterebbe movimenti protoplasmatici attivi durante il periodo febbrile, emetterebbe prolungamenti verso la periferia del globulo e si potrebbero così osservare 2-3 pseudopodi procedere manifestamente dal bordo del parassita. Cessato il periodo febbrile, i parassiti perderebbero le loro proprietà ameboidi e resterebbero immobili nel centro del globulo infetto, sotto forma di una massa rotonda.

Nel principio della malattia non si osserva che un solo parassita in ogni globulo infetto, voluminoso, rotondo. Più tardi i globuli invasi aumentano di numero, e molti contengono più di un parassita. È allora che si possono osservare ematozoi piriformi, riuniti o non per le loro estremità; ma queste forme a pera sono sempre rarissime. Verso la fine del periodo febbrile o subito dopo, compaiono le forme ameboidi più svariate: il parassita può apparire poliedrico o allungato o come ramificato: il suo contorno è irto di punte, di pseudopodi talora finissimi e simulanti flagelli ondulati o contorti.

Nelle forme lente della malattia i parassiti invece sono arrotondati e sembrano più piccoli: è raro osservare in questi casi più di un parassita in una stessa emazia.

Il volume del piroplasma varia secondo l'età del malato: nei cani molto giovani è più grande; e i parassiti liberi nel plasma sarebbero più voluminosi di quelli intraglobulari.

Il piroplasma si moltiplica per divisione diretta, e la moltiplicazione è più che mai attiva durante il periodo febbrile. Il sangue della circolazione generale non è favorevole all'osservazione, perchè quivi la divisione si compie troppo presto, in modo irregolare, disordinato: nei capillari degli organi interni la divisione avviene più lentamente e si può più facilmente seguire.

La sostanza cromatica o nucleo si strozza nella linea mediana, e i due nuclei così derivati si allontanano l'uno dall'altro per raggiungere i due poli opposti: nello stesso tempo il protoplasma si condensa lungo la linea equatoriale, cosicchè ogni nucleo sembra occupare il centro di una zona incolora, nella quale il protoplasma si va sempre più rarefacendo. Poi anche il protoplasma si allunga e si divide in modo che i nuovi parassiti, allungati in forma di pera, rimangono uniti da un sottile filo. I parassiti così formati si arrotondano e si moltiplicano di nuovo, e subito, sino a 16 e più: e poi per rottura del globulo disteso o aumentato di volume sono messi in libertà e vanno ad infettare nuovi globuli.

Nocard e Motas non accennano ad alcuna divisione in forme di schizogonia o di sporogonia del parassita. Galli Valerio dice che verosimilmente il parassita deve compiere un ciclo sessuale nel corpo delle zecche, le quali servirebbero da ospite intermedio. In questo caso i prolungamenti che, insieme a Piana, ha osservato sull'orlo di alcuni parassiti liberi nel plasma, si potrebbero ravvicinare ai flagelli degli emosporidi dell'uomo o degli uccelli e ritenersi perciò come gameti.

Thomas e Bohwill nella piroplasmosi canina del Sud Africa hanno osservato alcuni parassiti endoglobulari, i quali mostrerebbero dei processi simili a flagelli, alcuni con un solo rigonfiamento terminale, altri con due rigonfiamenti nel flagello.

Il sangue, nei casi osservati, è stato esaminato coi comuni metodi di colorazione: bleu di metilene boracico, liquidi Romanowski, Giemsa.

Come per la piroplasmosi bovina, noi raggrupperemo le forme osservate in:

1° *forme rotonde;*

2° *forme a pera.*

Nelle *forme rotonde* distinguiamo forme piccole e forme grandi: come nella piroplasmosi bovina, questa distinzione è basata sul fatto che mentre le forme piccole non sono mai isolate, ma sempre riunite in due o più in uno stesso globulo, invece le forme grandi sono sempre sole nell'interno di un globulo rosso.

Coi liquidi Romanowski e Giemsa, le forme piccole (fig. 13-14) sono costituite di sostanza cromatica e di protoplasma. In molte, specie nelle più piccole, la sostanza cromatica è così scarsa, che difficilmente si riesce a vedere, onde il parassita fa l'impressione come se costituito dalla sola massolina di cromatina, ricordando quelli che il Lignières chiama corpuscoli germi. In genere queste forme piccolissime sono riunite a 2, 4, 8, 12 nell'interno di un globulo rosso.

Nelle forme alquanto più grandi, che sono per lo più a 2, la cromatina è riunita in un blocchetto rotondo, collocato eccentricamente sull'orlo del parassita, senza sporgere dal margine: la massa

protoplasmatica è colorata uniformemente: raramente abbiamo osservato forme anulari.

Le forme *rotonde grandi* (fig. 15) sono collocate nel mezzo del globulo rosso. La porzione centrale del protoplasma è colorata meno intensamente della periferica; la cromatina è disposta sull'orlo, sotto forma di una falciuola o sotto forma di granuli separati.

Le *forme a pera* (fig. 16) sono frequenti quanto le forme rotonde, hanno l'aspetto caratteristico del pirosoma bigemino e sono separate o riunite a due per l'estremo assottigliato: la cromatina è riunita in un blocchetto vicino all'orlo o distesa lungo la periferia. Qualche volta si trova una sola forma entro un globulo rosso, spesso due, talora quattro e più in uno stesso globulo, alcune sono libere nel plasma. Abbiamo osservato anche forme endoglobulari, le quali hanno l'aspetto di un cuore (fig. 17): l'estremo ottuso presenta una insenatura.

Nel decorso acuto della malattia noi abbiamo riscontrato quasi in ugual proporzione le forme rotonde e le forme a pera: nelle forme croniche si riscontrano nel sangue circolante solo le forme rotonde grandi.

Riguardo all'interpretazione delle forme rilevate per ricostruire il ciclo di sviluppo del parassita, valgono le stesse osservazioni che abbiamo fatto per i parassiti della piroplasmosi bovina: anche qui le forme a cuore, che accennano alla riunione di due forme a pera in una unica, possono far pensare a una fase di coniugazione.

Riguardo a una differenziazione sessuata del parassita, abbiamo già ricordato l'ipotesi di Galli Valerio e l'osservazione di Thomas e Bohwill. Lignières nella piroplasmosi bovina ammette che i corpuscoli germi, ridotti cioè alla sola cromatina, siano le forme resistenti, le quali conservano la infezione anche nelle zecche. In appoggio di questa ipotesi del Lignières starebbero le osservazioni di Nocard e Motas sulla piroplasmosi canina. Questi autori hanno osservato che conservando il sangue defibrinato di cane a 37° o alla temperatura dell'ambiente o nell'interno delle sanguisughe, i parassiti, per una specie di condensazione o di contrazione del protoplasma, diminuiscono col tempo di volume al punto da sembrare dopo qualche settimana ridotti al solo nucleo. E il sangue conserva la sua virulenza nell'inverno, all'oscuro, anche dopo 25 giorni.

Paragonando l'aspetto morfologico dei parassiti riscontrati nelle piroplasmosi dei cani in Eritrea con quello dato dal Nocard e Motas per la piroplasmosi in Francia, crediamo poter rilevare alcune differenze.

Nella piroplasmosi in Francia, le forme a pera del parassita sarebbero rarissime, mentre nei nostri casi la frequenza è pari a quella delle forme rotondeggianti. Inoltre ci sembra, per quanto valore possa avere il raffronto, che in rapporto al volume delle emazie, i parassiti dell'Eritrea siano alquanto più piccoli di quelli della Francia, e che la sostanza cromatica sia in maggior quantità in rapporto alla massa protoplasmatica. Un'altra differenza sarebbe nelle alterazioni che il parassita induce nel globulo rosso. Nella piroplasmosi di Francia il globulo rosso sarebbe impallidito e aumentato di volume dal parassita. Noi non abbiamo osservato questo che come fatto raro, per esempio, nei casi in cui il globulo rosso è disteso da un numero rilevante di parassiti; ma in genere abbiamo veduto le emazie conservare il loro volume e il loro colorito normale.

Infine è da notare che esistono alcune *differenze fra i parassiti della piroplasmosi bovina e quelli della piroplasmosi canina;* infatti le forme del pirosoma nel bue sono molto più grandi, in rapporto al globulo, di quelle del cane, ma sono meno ricche in cromatina: le forme anulari sono rare nel cane, l'infezione del globulo è limitata nel bue, perchè non si riscontra mai un numero così rilevante di parassiti come si può trovare nel cane (fino a 12) entro uno stesso globulo rosso.

***

Il piroplasma canis si può sviluppare solo nell' organismo del cane; esso non si trasmette che da cane a cane. Nocard e Motas non sono riusciti a trasmettere la malattia ad un animale di altra specie, qualunque fosse il processo di inoculazione seguito, la quantità di sangue inoculata, la sua ricchezza in parassiti: senza risultato noi abbiamo inoculato milza e midollo delle ossa di bue morto di piroplasmosi acuta in un cane giovanissimo. Noi non abbiamo esperienze in proposito: tuttavia sarebbe da ricercare se l'infezione si possa trasmettere allo sciacallo, specie animale molto vicina al cane, comune nella colonia Eritrea.

La malattia non è trasmissibile per le vie digerenti, e nemmeno colla coabitazione (Robertson): come nelle piroplasmosi in genere, l'infezione è trasmessa da zecche.

Questa dimostrazione è stata sperimentalmente data dal Lounsbury per la prima volta nel sud Africa: la zecca trasmettitrice è stata riconosciuta per la Haemaphysalis leachi (Audouin).

In Inghilterra la malattia è sconosciuta: ora il Nuttall è riuscito a riprodurla nel cane a Cambridge per mezzo di zecche adulte infette, inviategli dal sud Africa dal Lounsbury.

Fatto importante, rilevato dal Lounsbury, che il Nuttall ora sta controllando, è che nè le larve, nè le ninfe derivate da zecche infette, sono capaci di trasmettere la malattia: è la zecca adulta, e soltanto essa, che trasmette l'infezione.

Il fatto che la zecca continua ad albergare il parassita durante gli stadi del suo sviluppo e che la zecca adulta, come nelle esperienze del Nuttall, è capace ancora di infettare dopo 5-6 mesi, starebbe a dimostrare che il parassita probabilmente dovrebbe compiere una parte del suo ciclo di sviluppo nel corpo stesso della zecca. Il Lounsbury dice:

« Il piroplasma del cane è trasmesso dalle zecche madri alla progenie, ma la progenie è incapace di trasmettere l'infezione, finchè non ha raggiunto lo stato adulto. Che l'infezione si possa trasmettere attraverso le uova, è un fatto già noto per altre infezioni, ma che nella vita delle zecche vi siano due stadi di sviluppo, nei quali esse siano infettate senza capacità di infettare, è al presente un fatto unico; è un fatto che differenzia questa malattia dalla piroplasmosi dei buoi e dimostra che le zecche non sono puramente semplici agenti di trasmissione ma ospiti secondari del parassita. »

Un fatto analogo però avrebbe trovato recentemente il Motas (15) nella piroplasmosi ovina: la zecca agente, il Rhipicephalus bursa, trasmetterebbe la malattia solo allo stato adulto.

A giustificare la distinzione tra la piroplasmosi canina del sud Africa e quella di Europa, il Nuttal riferisce la distribuzione geografica dell'Haemaphysalis leachi. Questa specie sembra essere quasi limitata al continente africano. Neumann riferisce che essa è stata trovata in Egitto da Savigny, a Monzambicco da Karsch, nell'Etiopia Est da Antinori, nel West Africa da Mocqueryson, in Algeria da Fayet, nella Sierra Leone da Trouessart, nel libero Congo, nel Transval, nella Colonia del Capo.

Nell'Europa, Piana e Galli Valerio sospettarono in Italia l'*Ixodes reduvius*, il quale è largamente distribuito nel continente europeo e si riscontra anche nel nord Africa e nel nord America.

Almy sospetta in Francia il *Dermacentor reticulatus* per aver trovato questa specie sui cani malati. Il Dermacentor è ampiamente distribuito e occorre nelle diverse contrade di Europa. Il Railliet ricorda la sua presenza in Francia e in Italia. Nocard e Motas in tutte le osservazioni raccolte in Alfort riscontrarono che i cani malati erano ricoperti di zecche, appartenenti alla specie *Dermacentor reticulatus.* Non sono però riusciti a infettare cani di controllo mediante larve, ottenute da zecche femmine raccolte sui cani malati: probabilmente però il risultato negativo si deve al fatto che gli autori hanno adoperato le larve e non gli insetti adulti.

Il Nuttall conclude che probabilmente l'Ixodes e il Dermacentor possono trasmettere i parassiti della piroplasmosi canina, ma al presente non è dimostrato.

Altri insetti, come pulci e pidocchi non sembrano ospiti adatti al parassita, perchè secondo Lounsbury la malattia non è stata osservata nei cani, che coabitavano con cani malati, in luoghi pieni d'insetti.

Immunizzazione e cura. — Nocard e Motas hanno cercato di realizzare l'immunizzazione degli animali con virus attenuati e con il siero.

Il sangue riscaldato a 45° perde ogni virulenza. Riscaldato a 44° durante 30 minuti, 50 minuti, 1 ora, il sangue resta virulento e uccide i piccoli cani inoculati, ma la morte è ritardata in rapporto alla durata del riscaldamento. Gli animali che resistono non rimangono immunizzati.

Il sangue invecchiato non manifesta proprietà vaccinanti.

Il sangue dei cani, i quali hanno superato felicemente un attacco della malattia, distrugge in *vitro* i piroplasmi; e questo potere si può rinforzare negli animali con inoculazioni ripetute di sangue virulento. Simili proprietà, ma in grado minore, possiede il siero di montone trattato con iniezioni sottocutanee o intravenose di sangue infetto.

Il siero dei cani iperimmunizzati, alla dose di 3-5 cmc. protegge gli animali contro l'inoculazione di 3-5 goccie di sangue virulento, che uccide certamente i cani di controllo. Può anche impedire la morte degli animali iniettato 24 ore e anche 42 ore dopo l'inoculazione del virus, ma è senza azione se si interviene dopo la comparsa del parassita nel sangue.

La *cura* con sostanze medicamentose ha dato varî risultati.

Piana e Galli Valerio hanno impiegato il bromidrato di chinino per inoculazione sottocutanea. Nel Sud Africa l'Hutcheon avrebbe ottenuto buoni risultati con dosi ripetute di cloruro d'ammonio e di belladonna; così pure sembrano avere buoni effetti il calomelano e il benzoato di sodio: nelle forme croniche il Nocard e Motas consigliano l'arrhenal sotto cute.

Nell'Eritrea, nell'oscurità completa della diagnosi, si adoperavano gli anti-elmintici e le iniezioni sottocutanee di preparati di ferro.

In due casi, dopo accertata la diagnosi, noi abbiamo tentato le iniezioni sottocutanee di chinino e gli animali sono guariti, avendo presentato degli *ascessi* in qualcuno dei luoghi di iniezione.

Il dott. Mozzetti, per la sua lunga esperienza e per le ripetute osservazioni, ci riferì che aveva potuto notare come la guarigione avvenisse più facilmente in cani, i quali, in seguito a inoculazioni sottocutanee di medicamenti, avevano avuto degli ascessi.

Per varie ragioni noi abbiamo cercato di vedere quale azione avesse sul decorso della malattia la provocazione artificiale di un ascesso. I risultati sono stati notevoli: su 12 casi così trattati, abbiamo avuto 12 guarigioni. Inoculavamo nella regione pettorale dei cani malati dell'essenza di trementina pura (da 5 a 10 goccie). Si determinava così una violenta reazione locale, accompagnata da forte elevazione di temperatura. Aperto l'ascesso, dopo 2-3 giorni,

cadeva rapidamente la febbre, le condizioni generali dell'animale miglioravano, la sanguificazione tornava rapidamente al normale; e i cani, senza presentare più alcun sintomo di malattia, in breve periodo di tempo si ristabilivano completamente.

Accenniamo per ora solo i fatti constatati senza tentare di darne una spiegazione, se cioè l'effetto della iniezione di trementina si debba attribuire alla forte elevazione di temperatura che segue alla iniezione, o alla iperleucocitosi che si determina, o alla messa in libertà, dal corpo dei leucociti stessi, di citasi capaci di avere azione sul piroplasma.

Sono in corso esperienze per vedere se tale trattamento corrisponda anche nella piroplasmosi bovina.

C) Tripanosomiasi.

Nella Colonia Eritrea nessun lavoro e nessuna osservazione accennava alla presenza di una tripanosomiasi nel bestiame. Nei primi di luglio 1903 avevamo nel laboratorio in Asmara un torello proveniente da Adi-Nogò, il quale era stato inoculato sotto cute con il sangue tolto, durante il periodo dell'ipotermia, dalla giugulare di una vacca malata di peste bovina.

Il torello ha presentato in generale il decorso e il quadro clinico della peste, ma si ebbe a notare qualche irregolarità nel decorso della temperatura e qualche anormalità nella sintomatologia.

Tre giorni prima che l'animale morisse, l'esame del sangue ci rivelò la presenza di numerosi tripanosomi.

Possiamo assolutamente escludere che il torello sia stato infettato con il sangue pestoso inoculato, perchè l'esame microscopico di questo è stato negativo, e l'inoculazione fatta contemporaneamente nelle pecore (sensibilissime, come vedremo, al tripanosoma) non ha avuto alcun esito. Dobbiamo quindi ritenere che la tripanosomiasi sia stata latente nel bovino e che l'infezione pestosa l'abbia resa manifesta. Osservazioni del resto, sulla possibile latenza dell'infezione tripanosomica negli animali, non mancano.

Nell'Istituto Pasteur, Caroungeau (16) osservò che alcuni dei cavalli annamiti, impiegati per la preparazione del siero contro la peste bubbonica, presentarono durante l'immunizzazione i sintomi del così detto « morbo coitale » con la presenza nel sangue di un tripanosoma, mai prima d'allora rilevato. Si trattava quindi di un vero parassitismo latente: il tripanosoma, rimase inattivo nell'organismo finchè una causa debilitante gli permise di esercitare la sua azione patogena.

Così sembra che una pregressa malattia abbia reso possibile ed evidente l'infezione con il tripanosoma del mal de Caderas in un montone (Lignières) (17).

Nei primi tempi noi abbiamo dovuto studiare il tripanosoma associato alla peste bovina negli animali da esperimento, buoi e pecore, perchè nei tentativi di isolare il tripanosoma mediante inoculazione in animali non suscettivi alla peste bovina, abbiamo riscontrato che cani e topi sono anche insensibili all'azione del tripanosoma. Distingueremo quindi le nostre osservazioni sui bovini in due gruppi: *infezione mista* (peste bovina e tripanosoma), *infezione da tripanosoma.*

Infezione mista. — La peste bovina e la tripanosomiasi nella doppia infezione sembrano associarsi nei loro effetti, ma domina sempre il quadro della peste bovina. La morte dell'animale avviene in 8-9 giorni.

Riferiamo il decorso e il quadro clinico del torello n. 7 di protocollo, inoculato con virus misto, vale a dire con sangue pestoso ricco di tripanosomi.

Il decorso della temperatura è stato molto irregolare: come nella peste bovina la temperatura è salita rapidamente oltre i 40° in 4ª giornata dalla inoculazione, ma poi è discesa a grandi sbalzi sotto il normale non presentando il periodo di stato caratteristico e la rapida discesa per crisi come nella peste.

Clinicamente l'animale ha avuto le manifestazioni della peste: iperemia delle congiuntive e secrezione lacrimale, scolo dal naso ma poco accentuato, scarse lesioni boccali, lievi disturbi intestinali con emissione di feci liquide.

Due giorni prima della morte, l'animale si è disteso in terra con il collo in forte estensione: gli arti posteriori erano distesi, semiflessi invece gli anteriori. Presentava contrazioni muscolari prevalentemente toniche nel treno posteriore: clonico-toniche nel treno anteriore. Il torace era sollevato in fase ispiratoria: il respiro breve, superficiale, interciso: l'espirazione incompleta. Vi era anestesia nel treno posteriore fino alla regione lombare: ipoestesia nelle regioni dorsale e scapolare: riflessi corneali integri. In questo stato l'animale è morto in ipotermia.

Alla sezione si sono riscontrate le lesioni caratteristiche della peste bovina specie nell'abomaso. Si rilevava inoltre anemia delle mucose visibili, liquido sieroso, limpido, giallo-citrino nel cavo addominale: la milza, non aumentata di volume, non aveva però la consistenza normale come nella peste bovina, ma era facilmente spappolabile: lieve iperemia delle pie-meningi: emorragie sotto mucose nella vescica.

I tripanosomi sono comparsi nel sangue periferico al 4° giorno dall'inoculazione, si sono mantenuti più o meno abbondanti e sono scomparsi 24 ore prima della morte.

Noi abbiamo già veduto come la piroplasmosi, pur aggravando e rendendo fatale il decorso della peste, può essere rilevata clinicamente solo per la comparsa, non sempre costante, della emoglobina nelle urine; la triponosomiasi invece porta con sè nell'ultimo periodo della malattia una sindrome a carico del sistema nervoso centrale.

Tripanosomiasi. — Per studiare il comportamento del solo tripanosoma nei bovini, ci siamo serviti di animali i quali, o per aver già sofferto la peste bovina, o per essere stati da noi vaccinati, avevano acquistato l'immunità contro la peste stessa.

L'infezione non ha mai decorso acuto: in media si svolge in 30-40 giorni ed anche più. La temperatura ha una curva irregolare:

presenta elevazioni le quali raggiungono nella sera 40°. 5-41°, ma queste oscillazioni non sono regolari, nè continue.

Scarsa è la sintomatologia.

L'animale presenta un dimagramento progressivo, un lieve grado di anemia nelle mucose visibili; è pigro, tardo nei suoi movimenti. Si può avere arrossamento delle congiuntive con scarsa lacrimazione, un po' di secrezione nasale, quasi mai disturbi intestinali. Il pelo è irto, ruvido e nell'ultimo periodo possono apparire delle distrofie cutanee. Negli ultimi giorni l'animale rifiuta il cibo, ha sonnolenza e si corica facilmente. Circa 24–48 ore prima della morte si abbandona in terra con gli arti posteriori distesi in contrazione tonica; ogni tanto presenta qualche fugace contrazione clonica; gli arti anteriori hanno contrazioni clonico-toniche. Vi è anestesia nel treno posteriore, ipoestesia nelle regioni dorsali e scapolari. Dalla bocca fluisce abbondante la saliva: le palpebre sono divaricate, i bulbi ruotati all'interno, i riflessi corneali integri. Nessuna lesione a carico dell'udito; l'animale reagisce agli stimoli; gli sfinteri funzionano. Il torace è sollevato in fase inspiratoria, il respiro è superficiale, gemente. Il polso caudale è normale, il cuore debole. L'animale muore in ipotermia.

I tripanosomi sono presenti nel sangue ma non costantemente: essi appaiono al 4°. giorno dall'inoculazione e in generale la loro presenza n :circol periferico è in rapporto con le elevazioni febbrili.

All'autopsia si riscontra notevole dimagramento; le mucose sono pallide; le glandole inguinali e ascellari sono ingrossate, molli, e presentano emorragie al taglio. Nella cavità peritoneale ri riscontra notevole quantità di liquido limpido, giallo-chiaro: nessuna alterazione nel peritoneo parietale e viscerale. Il fegato è aumentato di volume, iperemico: la vescica biliare distesa per notevole quantità di bile oscura, fluida: la milza non è ingrandita. La mucosa dell'abomaso è edematosa, con qualche emorragia sottomucosa: in alcuni tratti dell'intestino si notano iperemie e piccole emorragie puntiformi. La vescica presenta talora emorragie sottomucose: l'urina è limpida. Nella cavità toracica si riscontra scarso liquido sieroso limpido nel pericardio. Il cuore aumentato di volume è in diastole, con emorragie sotto epicardiche di varia dimensione. Talora si riscontra enfisema polmonare.

In generale nei casi da noi esaminati il reperto isto-patologico è stato di poco rilievo. Abbiamo riscontrato lievi alterazioni a carico delle *glandole linfatiche*, della *milza* e dei *reni*.

Le *glandole linfatiche* presentano in qualche caso i follicoli non distinti, con aumento degli elementi linfoidi.

Nella *milza* si può notare una iperplasia degli elementi della polpa.

Nei *reni* i tubuli dilatati contengono nel loro lume un *detritus*, il quale sembra costituito dalla parte protoplasmatica delle cellule epiteliali, i cui residui si mostrano appiattiti e contengono i nuclei nettamente visibili, sebbene poco colorati.

In un caso abbiamo rilevato un ispessimento dell'endocardio, con chiazze di infiltrazione parvicellulare.

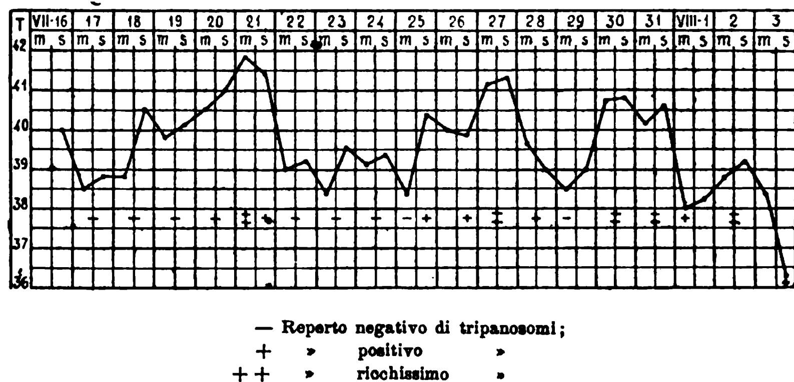
Nessuna alterazione apprezzabile ci è apparsa nel *fegato*, nel *cervello*, *cervelletto*, *midollo spinale*, *midollo delle ossa*, nei casi esaminati.

Le *razze ovine* nella colonia Eritrea sono molto sensibili al tripanosoma riscontrato nei bovini. Questa sensibilità è massima per la capra abissina (varietà della razza O. C. africana) e per la pecora abissina (varietà della razza O. A. africana): meno accentuata ci sembra, almeno dalle esperienze finora eseguite, nella pecora Habab o del Barca (varietà della razza O. A. sodanica). Questa diversa suscettività alla tripanosomiasi corrisponde perfettamente alla diversa sensibilità per la peste bovina, che presentano le razze ovine dell'Eritrea.

Le inoculazioni sono fatte sotto cute con sangue ricco di tripanosomi, tolto dalla giugulare di un cavallo infettato artificialmente.

Il decorso e il quadro clinico è lo stesso tanto nelle capre quanto nelle pecore. La malattia dura 14–20 giorni in media e sempre con esito mortale.

Diagramma 1° - Pecora abissina. Inoculazione sotto cute 5 cmc. di sangue ricco di tripanosomi = 16 agosto 1903: morte 3 settembre 1903.



— Reperto negativo di tripanosomi;
\+ » positivo »
\+ + » ricchissimo »

La temperatura ha decorso irregolare: presenta elevazioni anche fino a 41° 8, le quali si mantengono per 2–3 giorni; discende al normale per qualche giorno, per poi di nuovo riaccendersi; si abbassa rapidamente prima della morte.

Scarse sono le manifestazioni cliniche: l'animale dimagra, si anemizza un poco: raramente ha disturbi intestinali. Come nei bovini, qualche giorno prima della morte appaiono gravi disturbi nel sistema nervoso. Gli animali giacciono distesi in terra con la testa in forte estensione: presentano contrazioni clonico-toniche degli arti anteriori, prevalentemente toniche dei poste-

riori. Il respiro è frequente, superficiale, e la morte sopravviene dopo 24-48 ore.

Il passaggio del tripanosoma da pecora a pecora sembra ne aumenti la virulenza: un solo passaggio ha prodotto la morte in 8 giorni in due pecore: non abbiamo però per ora altre esperienze.

Anche limitate sono le nostre osservazioni sulle pecore Habab: in due pecore Habab e in una abissina, contemporaneamente inoculate con lo stesso sangue, abbiamo avuto la morte della pecora abissina in 10 giorni, delle pecore Habab in 43-45 giorni.

All'autopsia si rileva dimagramento dell'animale e anemia delle mucose visibili: lieve tumefazione delle glandole inguinali e ascellari: nel peritoneo si riscontra scarso liquido sieroso, talora siero-emorragico: nessuna lesione macroscopica nel fegato: la milza in qualche caso è lievemente aumentata di volume, con la polpa friabile. Scarse lesioni appaiono nel sistema digerente: qualche emorragia sottomucosa nello stomaco e iperemia nel tenue. I reni sono talora iperemici. Nessun altro fatto degno di nota.

Come nei bovini, così anche nelle capre, il reperto isto-patologico è di poco rilievo.

Le *glandole linfatiche*, il *fegato*, il *sistema nervoso centrale*, i *testicoli* non presentano alterazioni degne di nota.

Nei *reni*, si possono riscontrare lesioni di vario grado nei tubuli contorti a carico degli elementi epiteliali: questi in alcuni punti si presentano rigonfi, a limiti indistinti, con protoplasma di aspetto polverulento e con nucleo pallidamente colorato; in altri punti appaiono colpiti da necrosi.

In qualche caso vi era una iperplasia degli elementi della polpa splenica.

Il reperto parassitario nel sangue periferico non è costante: i tripanosomi appaiono in circolo in genere al 4° giorno dall'inoculazione: da prima scarsi, divengono sempre più numerosi per poi scomparire e successivamente tornare. In genere all'elevazione febbrile corrisponde presenza di tripanosomi nel sangue periferico.

Riguardo alla *razza equina* noi abbiamo le osservazioni di un cavallo e di un asino.

Il cavallo di razza abissina è stato inoculato sotto cute con cmc. 10 di sangue ricco di tripanosomi prelevato dalla giugulare di un torello.

L'animale non ha presentato alcuna reazione nel punto di inoculazione: noi lo abbiamo seguito dal settembre 1903 ai primi di febbraio 1904. Durante questi 5 mesi il cavallo ha presentato irregolarmente accessi febbrili. La prima elevazione di temperatura, all'8° giorno dall'inoculazione, ha coinciso con la comparsa dei tripanosomi in circolo. L'accesso febbrile durava generalmente 24 ore; qualche volta si protraeva anche per qualche giorno, e poi la tem-

peratura per crisi tornava al normale. Nell'esaminare il lungo diagramma della temperatura si rileva che gli intervalli apirettici oscillano tra 3–9 giorni e si rileva anche che i minimi della temperatura si vanno progressivamente abbassando, fino a raggiungere al mattino, nel mese di dicembre e gennaio, i 34°-35°: poi si sono risollevati oscillando tra 35°-36°.

Clinicamente l'animale ha presentato notevole dimagramento ed anemia profonda delle mucose visibili: non si è mai manifestato alcun edema negli arti, nelle regioni addominali o genitali. Ogni tanto presentava per breve periodo di tempo un'incoordinazione nei movimenti e accenni a paresi del treno posteriore: tali disturbi poi rapidamente scomparivano. Il sangue era divenuto sieroso, fluido: la coagulazione avveniva lentamente, le emazie si depositavano al fondo.

Nel gennaio trasmetteva ancora tipicamente la tripanosomiasi alle pecore.

I tripanosomi erano sempre presenti in grande quantità durante gli accessi febbrili, assenti nei periodi di apiressia (1).

Un asinello africano, inoculato con sangue di bue, ha presentato dopo 12 giorni una lieve elevazione febbrile di 24 ore, durante la quale si sono riscontrate nel sangue periferico scarse forme di tripanosomi. La temperatura si è poi mantenuta normale; il reperto nel sangue è stato sempre negativo; l'animale è morto dopo 5 mesi.

Clinicamente presentava dimagramento progressivo: ogni 15-20 giorni aveva paresi del treno posteriore, per la quale l'andatura diveniva barcollante, atassica: l'animale rimaneva coricato in terra, continuando a mangiare: senza presentare altri fenomeni, questi disturbi scomparivano dopo 3-4 giorni.

All'autopsia abbiamo riscontrato abbondante liquido sieroso nel peritoneo con albumina, leucociti e qualche emazia: nel piccolo bacino edema gelatinoso: il fegato, la milza, i reni erano normali: nessuna lesione nell'apparecchio digerente. Nelle cavità pleuriche e nel pericardio vi era liquido sieroso, limpido: attorno al cuore, specialmente lungo le coronarie, vi era edema giallastro gelatinoso. Nelle urine assenza di albumina.

Abbiamo inoculato infine sotto cute tre *scimmie*: un *Cercopithecus griseoviridis* e due *Cinocephalus amadrias*. Gli animali hanno avuto qualche accesso febbrile, senza altri fenomeni: il reperto del sangue è stato sempre negativo. Le nostre osservazioni si sono protratte per 4 mesi.

---

(1) Il cavallo è morto il 28 agosto 1904. Ha continuato a presentare a intervalli accessi di paresi del treno posteriore e fenomeni di incoordinazione nei movimenti.

Assolutamente refrattari si sono mostrati alle inoculazioni intratraperitoneali i topi grigi di casa e di campagna, i cani, le cavie e i conigli. Solo i topi, dopo 24 ore, hanno presentato per qualche giorno rare forme di tripanosomi nel sangue periferico, ma non hanno avuto alcun sintomo di malattia, e, sacrificati, non hanno mostrato alla autopsia alcuna lesione.

Descrizione del tripanosoma. — Abbiamo studiato il tripanosoma a fresco e in preparati colorati, sia con il bleu di metilene, sia con le speciali colorazioni di Romanowski e Giemsa. All'esame a fresco il protozoo ha la forma e l'aspetto comune a tutti i tripanosomi: presenta un corpo sottile, fusiforme, con protoplasma non omogeneo ma granuloso: un estremo del corpo assottigliato (estremo posteriore per la maggior parte degli osservatori, anteriore per altri) si prosegue in un lungo flagello: l'altro estremo è anche esso quasi aguzzo o lievemente arrotondato: tra l'una e l'altra estremità una membrana sottilissima percorre tutto il corpo del tripanosoma e si perde nel flagello. Quasi verso la metà presenta un corpo ovale, più rifrangente, il quale occupa quasi tutta la larghezza del tripanosoma e ha dei punti più brillanti: vicinissimo all'estremo non flagellato si osserva un punto molto rifrangente, al quale segue uno spazio ovalare più chiaro.

Le dimensioni del parassita variano nelle forme giovani e nelle adulte: le forme giovani sono lunghe 14-16 μ, le adulte 24 μ, compreso il flagello: la larghezza, misurata a livello del nucleo, è di 2-3 μ: non appare una differenza fra le forme osservate nel bue, nel cavallo, nelle pecore.

Il parassita è mobile, con un movimento serpentino ondulatorio: progredisce quasi sempre con l'estremo non flagellato, qualche volta con il flagello il quale è mobilissimo e sferza vivacemente i globuli rossi. La membrana ha un movimento ondulatorio, e le ondulazioni si dirigono dal flagello all'estremo opposto (il quale appare allora rotondo, ovoidale) oppure viceversa. Talora infine il tripanosoma presenta un movimento a scatto: il corpo si piega su sè stesso ad arco e si distende poi bruscamente. Mediante i movimenti combinati, del flagello e della membrana, il parassita si sposta rapidamente sotto il campo del microscopio. La mobilità del tripanosoma varia secondo l'età e secondo l'ospite. Le forme giovanissime hanno un movimento talmente vivace che l'occhio talora riesce a seguirle con difficoltà, senza potere apprezzare alcun particolare di struttura: le forme adulte hanno invece un movimento più lento. Il tri-

panosoma è più mobile nel sangue delle pecore e dei buoi che in quello del cavallo.

Nei preparati colorati i caratteri morfologici sono più evidenti.

Nelle colorazioni semplici il protoplasma appare colorato irregolarmente in bleu: presenta delle zone chiare e dei punti fortemente colorati.

Nelle colorazioni differenziali con il metodo Romanowski e Giemsa (fig. 18), il corpo protoplasmatico appare azzurro pallido, con qualche granulo colorato più fortemente. Vicinissimo all'estremo non flagellato, giace un corpicciuolo di cromatina rotondo od ovoidale, disposto lungo l'asse maggiore del parassita (micronucleo o nucleolo o centrosoma) (18): spesso l'estremità sembra costituita dall'ammasso di cromatina. Dal centrosoma, in evidente connessione con esso, parte un filamento di cromatina che si continua poi nel flagello: ad esso filamento è affidata la membrana ondulante, la quale è colorata pallidamente e non si prolunga oltre il corpo propriamente detto.

Quasi nel mezzo del corpo vi è il macronucleo o nucleo, il quale è costituito da un ammasso di cromatina, colorato più o meno uniformemente in rosso: è ovoidale ed occupa con il suo diametro minore quasi tutta la larghezza del parassita. Fra il centrosoma e il nucleo, vicinissimo al centrosoma, si riscontra il vacuolo, al quale, secondo Laveran e Mesnil non si può dare alcuna importanza, perchè è di forma e di posizione molto variabile e non appare nei preparati di sangue bene fissati: l'abbiamo disegnato nelle nostre figure, perchè riesce evidente anche nelle osservazioni a fresco. In qualche forma, sempre però adulta, si riscontrano sparsi nel protoplasma alcuni granuli di cromatina.

Forme di moltiplicazione. — La forma di moltiplicazione che noi abbiamo riscontrato nel sangue circolante è per divisione longitudinale.

Il parassita, raggiunta la sua massima lunghezza, perde la vivacità dei suoi movimenti. Il primo a dividersi è il centrosoma, collocato nell'estremo non flagellato: i due piccoli ammassi di cromatina, derivanti dalla divisione, si allontanano e si collocano parallelamente fra di loro, ma uno un po' più indietro dell'altro. Segue poi la divisione dell'ammasso centrale di cromatina il quale si allarga nella direzione della lunghezza del corpo: la sostanza nucleare più spesso si accumula nei due poli: e le due porzioni, che ne risultano, si spostano, e, come quelle derivanti dalla divi-

sione del centrosoma, non rimangono nello stesso piano, ma una viene a collocarsi di lato e inferiormente all'altra. La divisione del flagello sembra si inizii dal centrosoma: nelle forme in divisione abbiamo potuto riscontrare tra il centrosoma e il nucleo un filamento sottile colorato in rosso, che sembra quasi riunire i due ammassi di cromatina. Il Martini (19) ha appunto osservato nella divisione del Trip. del Nagana che il ciglio comincia a dividersi in vicinanza del centrosoma e la divisione si affonda sempre più in direzione del nucleo per poi raggiungere l'estremo flagellato. Dei due flagelli che derivano abbiamo potuto osservare anche noi che uno sembra più piccolo dell'altro.

Avvenuta la divisione dei nuclei e del flagello, segue la divisione del protoplasma, la quale si compie secondo una linea un po' obliqua, che si inizia circa a metà della distanza tra i due centrosomi dall'orlo protoplasmatico, passa fra i due nuclei e termina all'estremo flagellato. Così i due nuovi parassiti si separano fra di loro.

Plimmer e Bradford (20) hanno descritto nel tripanosoma del Nagana una divisione trasversale: noi non l'abbiamo mai osservata nel nostro tripanosoma.

Sotto il campo del microscopio abbiamo potuto osservare qualche volta che due tripanosomi adulti si avvicinano e si accollano strettamente per una piccola zona di contatto negli estremi non cigliati: il movimento delle membrane non fa più riconoscere la distinzione fra i due parassiti: si ha così l'impressione di un corpo fusiforme unico con due flagelli agli estremi. Dopo essere rimasti uniti per un periodo di tempo variabile fino a 30 minuti primi, i due tripanosomi si separano nuovamente, dando l'illusione di una divisione trasversale. Ziemann (21) emette il dubbio se possa trattarsi di una vera copulalazione tra parassiti maschili e femminili, i quali ultimi si distinguerebbero per una più intensa colorazione in bleu del protoplasma. Abbiamo riscontrato talora delle forme le quali avevano il protoplasma più intensamente colorato di altre, ma non abbiamo elementi sufficienti per ritenerle forme femminili. Secondo Laveran e Mesnil invece queste forme avrebbero solo il significato di forme iniziali di agglomerazione dei parassiti.

Abbiamo potuto seguire sotto il campo del microscopio la riunione dei tripanosomi nelle forme a rosetta: più tripanosomi si riuniscono per l'estremo non flagellato: si forma così una rosetta di un numero vario di individui, tutti con l'estremo non flagellato al centro e con i flagelli mobili alla periferia. Non abbiamo riscon-

trato accenni alla riunione a rosetta nel sangue, disteso sui vetrini e immediatamente fissato dopo la presa.

Oltre le forme tipiche del tripanosoma si riscontrano altre forme del parassita. Alcune hanno l'aspetto di un girino (fig. 21): l'estremo non flagellato è quasi sferico, il flagello, se ancora presente, appare cortissimo: il centrosoma e il nucleo sono presenti. Vi sono poi forme rotondeggianti (fig. 20) nelle quali si riconosce solo la presenza di due ammassi di cromatina, poco differenti fra loro per grandezza. A forme degenerative appartengono certamente delle forme immobili, quasi diafane, nelle quali è talvolta difficile percepire il contorno: al posto del nucleo si riscontrano più corpicciuoli rifrangenti: il centrosoma è appena riconoscibile: nel protoplasma si vedono parecchi vacuoli di varia dimensione.

Non sembra esservi un rapporto costante tra il decorso della temperatura e la presenza dei tripanosomi nel sangue periferico. Tanto nei buoi quanto nelle pecore, i tripanosomi appaiono in circolo solo al 4° giorno dall'inoculazione sottocutanea: nel cavallo sono comparsi all'8°, nell'asino al 12°, quasi in rapporto diretto con la diversa suscettibilità degli animali all'azione patogena del tripanosoma stesso. Nella pecora, della quale abbiamo presentato il diagramma, i tripanosomi, comparsi nel sangue al 4° giorno, sono aumentati in numero rapidamente e si sono mantenuti presenti per 48 ore: poi, caduta la temperatura, sono scomparsi dal circolo periferico e per tre giorni il reperto del sangue è stato negativo: al 9° giorno dalla inoculazione sono riapparse rare forme, la temperatura si è di nuovo innalzata e contemporaneamente i tripanosomi sono divenuti più numerosi. È certo che ad ogni accesso febbrile abbiamo constatato in tutti gli animali la presenza di tripanosomi nel sangue periferico: essi rappresentano una generazione nuova del parassita, perchè sono forme di piccola dimensione e vivacissime nei loro movimenti.

Durante l'apiressia il reperto in generale è negativo, ma non è escluso che si possano trovare presenti, sebbene in iscarso numero.

È sorprendente la scomparsa improvvisa dei tripanosomi. Abbiamo avuto occasione di esaminare una pecora poche ore prima della morte e trovare nel sangue un reperto ricchissimo, tanto da aversi 10-15 tripanosomi per ogni campo di microscopio. Dopo due ore l'animale morì: ed eseguita immediatamente l'autopsia non ci è stato possibile di osservare tripanosomi, almeno sotto il loro aspetto caratteristico, sia nel sangue del cuore, sia in tutti gli organi interni, midolla delle ossa, ecc. Come avvenga questa subitanea scom-

parsa dei parassiti, quali siano i loro residui o quale forma assumano da sfuggire all'esame microscopico, noi non siamo riusciti a decidere. Sta il fatto però che, quando anche non si trovano i tripanosomi negli esami microscopici, il sangue è sempre infettante.

Queste sono le osservazioni che abbiamo potuto fare in Asmara, nel laboratorio, con il tripanosoma trovato nel bue e rivelato dalla peste bovina.

Il reperto ci faceva supporre che dovesse esistere nella Colonia Eritrea un'*affezione del bestiame dovuta al tripanosoma.* Infatti, sulla fine di settembre 1903 abbiamo avuto occasione di esaminare una mandria di buoi, condotta da pastori nomadi, la quale dalla costa era salita verso Nefasit in cerca di pascolo. Molti degli animali erano malati da più tempo; presentavano clinicamente dimagramento più o meno accentuato, lieve flogosi catarrale delle congiuntive e qualche disturbo intestinale; non si riscontravano edemi. L'esame microscopico del sangue, prelevato da 22 animali malati, ci ha rilevato la presenza in 15 di essi di un tripanosoma identico a quello che abbiamo studiato.

La malattia è dagli indigeni conosciuta sotto il nome di *giaàn*: e dalle informazioni assunte sembra che essa risieda lungo il litorale e nella zona bassa del Sahel: avrebbe la stessa distribuzione geografica della piroplasmosi bovina. Sembra che la malattia abbia un decorso cronico, da pochi mesi a un anno; e gli animali più giovani sarebbero meno resistenti. Si manifesta più facilmente durante l'epoca della siccità, e i pastori affermano essere la malattia dovuta alla puntura di una mosca.

Nelle nostre ricerche noi non abbiamo trovato esemplari della mosca tsétsé: frequenti sono l'Hyppobosca e il Tabanus. In India è stato incolpato di trasmettere la surra il genere Tabanus (Tab. tropicus e lineola): in Giava, durante l'epizoozia di surra nel 1901, la malattia probabilmente era trasmessa da un Tabanus. Il Laveran (22) ha comunicato che le esperienze fatte dal Theiler sul tripanosoma del Transvaal, agente della cosidetta « Galziekte » nei bovini, hanno dimostrato che alcune specie del genere Hyppobosca, e più specialmente l'Hyppobosca rufipes e il maculata, sono capaci di trasmettere la malattia da animali malati ad animali sani.

Riassumendo le nostre brevi osservazioni, noi *abbiamo riscontrato nell'Eritrea un tripanosoma il quale è patogeno per i bovini e in sommo grado per le pecore: il cavallo e l'asino sembrano anch'essi suscettibili: tutti gli altri animali da esperimento, cani, topi, polli, cavie e conigli, si sono dimostrati refrattari.*

***

Vediamo ora brevemente *quali rapporti possa avere il tripanosoma da noi riscontrato in Eritrea con i tripanosomi finora studiati nelle infezioni degli animali utili.*

Nell'Eritrea e nell'Abissinia, nel Nord dell'Africa orientale, le indicazioni su tripanosomiasi degli animali o mancano o sono poco precise, come osservano Laveran e Mesnil.

Nell'Abissinia, Agatarchides e James Bruce avrebbero segnalato la presenza di mosche probabilmente tsétsé. Durante la spedizione inglese in Abissinia nel 1887, i cavalli morirono in gran numero: il veterinario Hallen, essendo poi stato nelle Indie, fu colpito dalla analogia fra la surra e questa epizoozia degli equini, ma secondo il Brumpt si trattava di peste equina (1).

Secondo Savouré (*Journal d'agriculture tropicale*) la surra infierirebbe nei buoi dell'Abissinia, e sarebbe stata importata dai buoi di Bombay, acquistati per le truppe italiane. Brumpt crede invece che sia la stessa malattia della valle della Djouba e dell'Africa orientale ancora più a sud, e basa la sua opinione sulle relazioni commerciali dell'Ogaden con queste regioni.

Noi ricorderemo qui solo le infezioni tripanosomiche negli animali utili, lasciando da parte le infezioni da tripanosomi dei pesci, batraci, rettili, uccelli e piccoli mammiferi (roditori, chirotteri, insettivori) e l'infezione da tripanosoma dell'uomo.

Le tripanosomiasi negli animali utili ben determinate sono sei:

1. *Surra.* Malattia in generale degli equini dell'India. Ha larga diffusione nell'Asia del Sud e nella Malaya: è stata riscontrata inoltre nell'Est Africa, e recentemente nelle isole Filippine e nell'isola Maurizio, dove ha cagionato gravi perdite anche nei bovini.

2. *Nagana.* Infierisce fra bovini, equini, ecc., in quasi tutta l'Africa del Sud e più specialmente lungo le rive dello Zambese, nei possessi inglesi e tedeschi dell'Est, nel Sudan, nella Somalia e probabilmente anche nell'Abissinia.

3. *Galziekte* o *malattia della bile*, la quale è enzootica nei bovini d'una gran parte dell'Africa del Sud.

4. *Dourine* o *mal del coito.* Malattia dei cavalli del Nord Africa e del Sud Europa, e più propriamente si può dire che domini attorno al bacino del Mediterraneo: è stata riscontrata anche in Siria, nell'Asia Minore e nel Chilì.

5. *Mal de Caderas.* Malattia degli equini nell'America del Sud (Paraguay, Brasile, Perù, Nord della Repubblica Argentina).

6. *Tripanosomasi dei cavalli di Gambia.* L'agente patogeno, il *Trip.*

---

(1) Vedi in questi Annali, questo fascicolo, la *Memoria sulla peste equina.*

dimorphon, si differenzia morfologicamente da tutti i tripanosomi ben caratterizzati per la doppia forma, lunga e corta, sotto la quale si presenta. Determina negli animali da esperimento una malattia acuta o subacuta (roditori, cani e bovini) o una malattia cronica (capre e montoni).

Attorno a queste sei malattie, bene individualizzate, si raggruppano altre osservazioni di infezioni da tripanosomi negli animali, le quali e per il decorso clinico e per i caratteri morfologici dei parassiti si avvicinano più o meno alle infezioni classiche descritte. Laveran e Mesnil si domandano se tutte le malattie da *tsétsé* osservate in diverse regioni dell'Africa costituiscano una entità morbosa unica o piuttosto un gruppo di malattie certamente affini, ma aventi ciascuna la sua individualità. La questione è lungi dall'essere risolta, e gli autori raggruppano attorno alla nagana le epizoozie africane degli equini e dei ruminanti, dovute a tripanosomi, l'individualità dei quali non è ancora bene stabilita. Tali sarebbero:

1. Tripanosomiasi nei bovini dell'Est Africa tedesco.
2. Tripanosomiasi di Togoland negli equini e nei bovini.
3. Tripanosomiasi degli equini in Algeria.
4. Tripanosomiasi dei bovini nel Sudan francese.

Vi sono poi le osservazioni su una tripanosomiasi dei dromedari in Algeria (*El Debab*) e una tripanosomiasi dei dromedari nel Sudan (*Mbori*), le quali probabilmente possono avere un centro comune di origine e sembrano trasmesse da tabani. Noi le ricordiamo, perchè esiste nella Colonia Eritrea una malattia dei dromedari, molto temuta dai conducenti le carovane e denominata *malattia della mosca*. Sospettiamo si tratti di una tripanosomiasi, ma non ci è stato possibile, durante la nostra permanenza in Colonia, osservare alcun caso della malattia.

Una differenziazione dei varii tripanosomi in base ai caratteri morfologici, secondo le ricerche comparative di Rabinowitsch e Kempner (23), e secondo i dati di Laveran e Mesnil non appare possibile. La forma dell'estremo non flagellato, la posizione del centrosoma, la maggiore o minore granulazione del protoplasma sono tutte particolarità morfologiche che, nelle diverse specie animali e anche in uno stesso preparato di un animale, mostrano tale variabilità da rendere difficile la differenziazione di una singola specie.

Il nostro tripanosoma si differenzia in modo netto dal *tripanosoma del Caderas* per la facile dimostrabilità e per le dimensioni del centrosoma, nonchè per l'azione patogena sui bovini ed ovini; dal *tripanosoma della Galziekte* per le sue dimensioni più piccole, e per essere patogeno per altri mammiferi oltre i bovini; dal *tripanosoma dimorphon* per la parte libera del flagello, e perchè le forme più piccole del nostro non sono che stadii giovani e transitori del parassita; dal *tripanosoma della dourine* perchè i bovini sono refrattari a questa malattia.

Quindi *la tripanosomiasi dei bovini in Eritrea si ravvicinerebbe alla nagana e alla surra, ma se ne differenzia per alcuni caratteri.*

Il tripanosoma dell'Eritrea è *molto mobile*, e nelle forme giovanissime il movimento è vivacissimo; può darsi che il *trip. vivax*. accennato recentemente in Kamerun dallo Ziemann (11), si avvicini al nostro.

Nel decorso clinico non abbiamo riscontrato mai *edemi* nell'infezione naturale e negli animali da esperimento, nè *lesioni cutanee*; costante è la *sindrome nervosa*, che appare negli ultimi giorni prima della morte.

Il tripanosoma dell'Eritrea è *patogeno in alto grado per le razze ovine*. Secondo Bruce le capre e i montoni indigeni sono meno sensibili alla nagana che gli altri mammiferi, e la malattia ha in loro un decorso cronico di circa 5 mesi; le capre, secondo alcuni, sono del tutto refrattarie alla surra, o, secondo altri, guariscono costantemente dopo una lunga malattia di 5-6 mesi. Nelle nostre esperienze i *cani* e i *topi* appaiono *refrattari* all'infezione, mentre questi animali sono i migliori reattivi per la surra e per la nagana.

Più difficile riesce differenziare la tripanosomiasi dell'Eritrea dalle altre *tripanosomiasi africane*, sebbene anche qui, per la virulenza e per l'azione patogena del tripanosoma, si allontani dalle tripanosomiasi dell'Est Africa Tedesco, di Togoland e degli equini in Algeria, ricordando un po' più da vicino la tripanosomiasi dei bovini nel Sudan.

Per volere però ammettere una nuova varietà di tripanosoma occorrerebbe il criterio delle inoculazioni in animali già immunizzati contro le altre infezioni tripanosomiche; queste ricerche noi non abbiamo potuto fare per mancanza di materiale e di tempo.

*
* *

Riteniamo da ultimo importante riferire un'*osservazione fatta in un bovino* negli ultimi giorni della nostra permanenza in colonia, osservazione la quale disgraziatamente è rimasta isolata ed è incompleta.

Insieme con gli animali sieroproduttori noi avevamo un bue abissino di circa due anni, il quale era stato vaccinato nei primi di novembre 1903 contro la peste bovina, con virus di pecora e siero. La vaccinazione aveva avuto un decorso regolarissimo: non vi era stato nessun fatto degno di nota, tranne l'elevazione della temperatura, la quale si era mantenuta per quattro giorni.

L'animale era in ottime condizioni di salute e noi ci accingevamo a trasformarlo in sieroproduttore.

Il 27 dicembre, nel mattino, l'animale appariva sonnolento, si coricava facilmente in terra e rifiutava di andare al pascolo. Verso le 10 antime-

ridiane presentava il seguente quadro: l'animale era in piedi, immobile, con la testa bassa e le orecchie alquanto pendenti; gli occhi chiusi come se dormisse. Scarsa la ruminazione, il respiro normale. Nessun fatto apprezzabile all'esame obbiettivo a carico del sistema digerente, circolatorio e respiratorio. Se nulla si poteva rilevare di anormale nella vita vegetativa, gravi invece erano i disturbi nella vita di relazione. L'animale sembrava in uno stato di catalessi. Vi era una sospensione completa delle manifestazioni volontarie: sopra tutto degno di nota era l'attitudine che presentavano i muscoli della vita di relazione a conservare per un tempo più o meno lungo gli atteggiamenti che venivano loro impressi, per quanto questi fossero strani ed incomodi. Le pose più grottesche e più comiche si potevano mantenere per trenta minuti e anche per qualche ora, alterando in parte le leggi della gravità e della fatica muscolare (Vedi Tav. II).

Collocata la coda sul fianco, l'animale non faceva alcun movimento per muoverla; incrociate le gambe anteriori in modo che potesse appena reggersi in equilibrio, rimaneva per lungo tempo in quella posizione di facile stanchezza; collocato il muso entro un recipiente con acqua in modo che il nasello e le narici fossero completamente immersi, l'animale non sollevava affatto la testa. La sensibilità generale era però conservata: dietro forti stimoli il bue si destava dal letargo: apriva gli occhi per richiuderli subito e ricadere nello stato primitivo. La temperatura era 37°.4.

Trascriviamo il diario:

28 dicembre. — L'animale è nelle medesime condizioni di ieri.

29 dicembre. — L'animale è disteso in terra: ha contrazioni toniche del treno posteriore. Rifiuta gli alimenti e le bevande. Reagisce agli stimoli. La respirazione è intercisa. Temperatura 40°.

30 dicembre-4 gennaio. — L'animale è rimasto sempre nel medesimo stato: la vita vegetativa ha continuato, rallentandosi di giorno in giorno. Vi è stata emissione ripetuta di feci solide e di urine limpide. Il respiro era superficiale e frequente, talora profondo e raro. Ha avuto emissione di liquido spumoso dalle nari e dalla bocca. La temperatura è stata sempre fra 35°-36°.

5 gennaio 1904. — L'animale è morto nelle prime ore della notte.

L'esame del sangue ripetuto tutti i giorni non ha dimostrato la presenza di alcun parassita. È stata fatta la puntura lombare: l'esame del liquido cefalo-rachidiano centrifugato non ha fatto rilevare alcun elemento degno di nota.

All'autopsia abbiamo riscontrato dimagramento notevolissimo. Nella cavità addominale nessuna lesione apprezzabile: milza normale, fegato lievemente aumentato di volume, fatti ipostatici nella metà sinistra corrispondente al decubito dell'animale. Intestini normali, quasi vuoti; nello stomaco scarsi residui alimentari. Nella cavità toracica: pleuro-polmonite ipostatica a sinistra, versamento siero-emorragico nel pericardio, cuore in diastole con coaguli rossi nei ventricoli.

Aperta la cavità del cranio, è fuoruscita abbondante quantità di liquido cefalo-rachidiano limpido. La dura madre era ispessita, alquanto aderente e iniettata; sotto le pie meningi si intravedevano chiazze rossastre in corrispondenza dei lobi frontali, più accentuate a destra: assenza di liquido o di essudati sotto l'aracnoide. Il cervello era diminuito di resistenza: nel

lobo frontale di destra si riscontrava un vasto focolaio di rammollimento rosso, circondato alla periferia da una zona iperemica cosparsa di emorragie di varia dimensione, digradanti dal focolaio di rammollimento verso il tessuto sano.

Un focolaio di rammollimento più limitato si riscontrava nel lobo frontale di sinistra. Nessuna lesione apparente del ponte, cervelletto, midollo allungato, midollo spinale.

All'esame microscopico, in mezzo a un detritus costituito da residui di cellule e fibre nervose, di corpuscoli sanguigni e di leucociti (alcuni dei quali con granuli di pigmenti ematici) si riscontravano numerosi tripanosomi.

Nei loro caratteri morfologici i parassiti sembrano discostarsi alquanto dal tripanosoma da noi studiato. Il corpo del protozoo (fig. 21) è più snello, e l'estremo non flagellato è affilato e termina in una sottile punta, ricordando in qualche modo l'aspetto del tripanosoma Lewisii; la lunghezza del parassita è di 26–28 μ e la larghezza di 2-3 μ. A qualche distanza dall'estremo non flagellato giace il centrosoma, cui segue il vacuolo; il nucleo è collocato nella metà del corpo: l'unione del filamento col centrosoma non appare evidente.

I movimenti del protozoo sono limitatissimi per le condizioni fisiche dell'ambiente nel quale si trova; predominano i movimenti di contrazione del corpo protoplasmatico, mentre limitati sono i movimenti del flagello e della membrana ondulante.

Nella maggior parte dei tripanosomi si riscontrano, con le colorazioni speciali, numerosi granuli di cromatina sparsi irregolarmente nel protoplasma e in essi non riescono evidenti il centrosoma e il nucleo, al cui posto si osservano più granuli di sostanza cromatica. Predominano le forme a girino e le forme rotonde (fig. 22), grandi quasi come un'emazia; in esse, in mezzo a un protoplasma granuloso con vacuoli, si possono riconoscere uno o due granuli di cromatina.

Gli esami ripetuti di tutti gli organi dell'animale non ci hanno rilevato la presenza di tripanosomi; le ricerche batteriologiche non hanno dimostrato alcun microrganismo.

Le inoculazioni di emulsione in soluzione fisiologica della sostanza cerebrale in pecore, cani, scimmie e buoi non hanno avuto esito.

Sebbene l'osservazione sia isolata, noi la riteniamo degna di rilievo, sia per la sintomatologia presentata dall'animale, sia per le lesioni speciali nel cervello determinate dal tripanosoma.

Solo nella tripanosomiasi degli equini, studiata da Szewzyck e Rennes nella valle della Zousfana, il Rennes insiste sui fenomeni accentuati di ebetudine e di sonnolenza, presentati dai cani nelle inoculazioni sperimentali, rilevando l'analogia sintomatica di questa malattia del cane con la malattia del sonno nell'uomo.

Nella dourine si riscontrano nel midollo spinale focolai di rammollimento, estesi 6-8 cm.: e tale lesione anatomo-patologica non si osserverebbe, secondo Laveran e Mesnil in nessuna altra malattia da tripanosomi.

Riguardo poi ai rapporti, che possono correre fra le tripanosomiasi degli animali e la tripanosomiasi umana, ricorderemo che Vallée in Alfort ha inoculato una vacca con sangue di un ratto fortemente infetto con il trip. gambiense. L'inoculazione ha avuto risultato positivo; non vi è stata reazione, nè tripanosomi all'esame istologico, ma il sangue della vacca si è mostrato virulento per il ratto; anche Thomas e Linton sarebbero riusciti a infettare un bovino (Laveran e Mesnil).

Noi crediamo che *il caso da noi osservato si potrebbe clinicamente definire come malattia del sonno nel bue, e si potrebbe ravvicinare alla malattia del sonno nell'uomo, alla sindrome cioè finale della tripanosomiasi umana.*

Conclusioni.

1° Anche nella Colonia Eritrea esiste la malaria dei bovini.

2° Nelle regioni fra il litorale e la zona media sembra regni enzootica; sull'altipiano non abbiamo riscontrato nessun caso spontaneo della malattia e quando esiste, l'infezione è latente.

3° La peste bovina o la vaccinazione antipestosa mettono in evidenza l'infezione latente.

La doppia infezione di malaria e peste è difficile a rilevarsi clinicamente: nella vaccinazione antipestosa invece il quadro della malaria bovina si svolge tipicamente.

4° Il piroplasma riscontrato sull'altipiano rassomiglia a quello descritto nelle piroplasmosi in Europa.

5° Non è improbabile che nel ciclo di sviluppo del piroplasma avvenga una coniugazione dei parassiti adulti, piriformi.

6° Si riscontra anche nella Colonia Eritrea la piroplasmosi canina.

I cani italiani importati e i cani di Cassala sono i più sensibili all'infezione. Il decorso e il reperto anatomo-patologico ricordano nei cani di Cassala la piroplasmosi canina del Sud-Africa: nei cani italiani invece la piroplasmosi canina della Francia.

8° La provocazione di un ascesso artificiale porta a guarigione i cani malati.

9° Nella Colonia Eritrea domina una tripanosomiasi nei bovini, lungo il litorale e nella zona bassa del Sahel.

10° La capra e la pecora abissina sono sensibilissime alla azione patogena del tripanosoma dei bovini: il cavallo e l'asino sembrano meno suscettivi: i topi, i cani e le scimmie sembrano refrattari.

11° L'infezione nei bovini potrebbe ravvicinarsi alla *nagana* o alla *surra*: se ne differenzia per la mobilità del tripanosoma, per l'assenza di edemi e di lesioni cutanee, per i disturbi nervosi che caratterizzano l'ultimo periodo della malattia, per la sensibilità delle razze ovine, per la refrattarietà dei cani e dei topi.

12° In un bue abbiamo osservato una sindrome morbosa che si potrebbe definire « malattia del sonno ».

Alla sezione dell'animale abbiamo riscontrato due focolai di rammollimento nei lobi frontali, prodotti da un tripanosoma, il quale era assente dal sangue, dagli organi e dal liquido cerebro spinale.

Roma, novembre 1904.

BIBLIOGRAFIA.

1. British medical Journal, 30 maggio 1903.
2. Ib., 11 luglio 1903.
3. Compt. R. des séances de l'Académie des sciences. T. CXXXVII, p. 597.
4. Annales de l'Institut Pasteur, 1899.
5. Centralblatt f. Bakteriologie. Bd. XXV, n. 4, 16 gennaio 1904.
6. Indian Medical Gazette, may 1904.
7. Questi Annali, 1904.
8. Archives de Parasitologie, 1903, n. 3.
9. Journal of Hygiene, vol. 4°, n. 2, 1904.
10. Prometheus, 1901, S. 35-49.
11. Deutsch. Colonialblatt, 10 luglio 1904.
12. Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XX, Heft 1.
13. Journal of Hygiene, vol. 4°, n. 2, 1904.
    La bibliografia sulla piroplasmosi canina è raccolta in modo completo in questo lavoro del Nuttall: *Canine piroplasmosis*.
14. The Journal of Tropical Medicine, vol. VII, n. 5, 1° marzo 1904.
15. Archiva veterinara. T. 1, Bukarest 1904.
16. Bulletin de la Société centrale de Méd. Vétér, 1901, p. 295.

17. Revista de la Sociedad médica Argentina. T. X, 1902.

18. Laveran et Mesnil. *Tripanosomes et tripanosomiases*. Paris, Masson 1904.

19. Festschrift zum sechzigsten Geburtstage von R. Koch. - Jena, 1903, p. 219.

20. Centralblatt f. Bakter. Bd. XXVI, p. 440.

21. Berl. klin. Wochens., 1902, n. 40.

22. Compt. R. de la Soc. de Biologie. T. LV, 21 febbraio 1903.

23. Centralblatt f. Bakt. Bd. XXXIV, n. 8.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I.

Piroplasmosi bovina (fig. 1-12):

Fig. 1- 4 — Forme rotonde piccole del parassita.

Fig. 5- 8 — Forme rotonde grandi.

Fig. 9-12 — Forme a pera. (Le figure 10-11 rappresentano probabilmente una fase di coniugazione dei parassiti).

Piroplasmosi canina (fig. 13-17):

Fig. 13 — Fase schizogonica del parassita.

Fig. 14 — Forme piccole rotonde.

Fig. 15 — Forma rotonda grande.

Fig. 16 — Forme a pera.

Fig. 17 — Probabile forma di coniugazione.

Tripanosomiasi dei bovini (fig. 18-22):

Fig. 18 — Tripanosoma adulto.

Fig. 19 — Forma a girino.

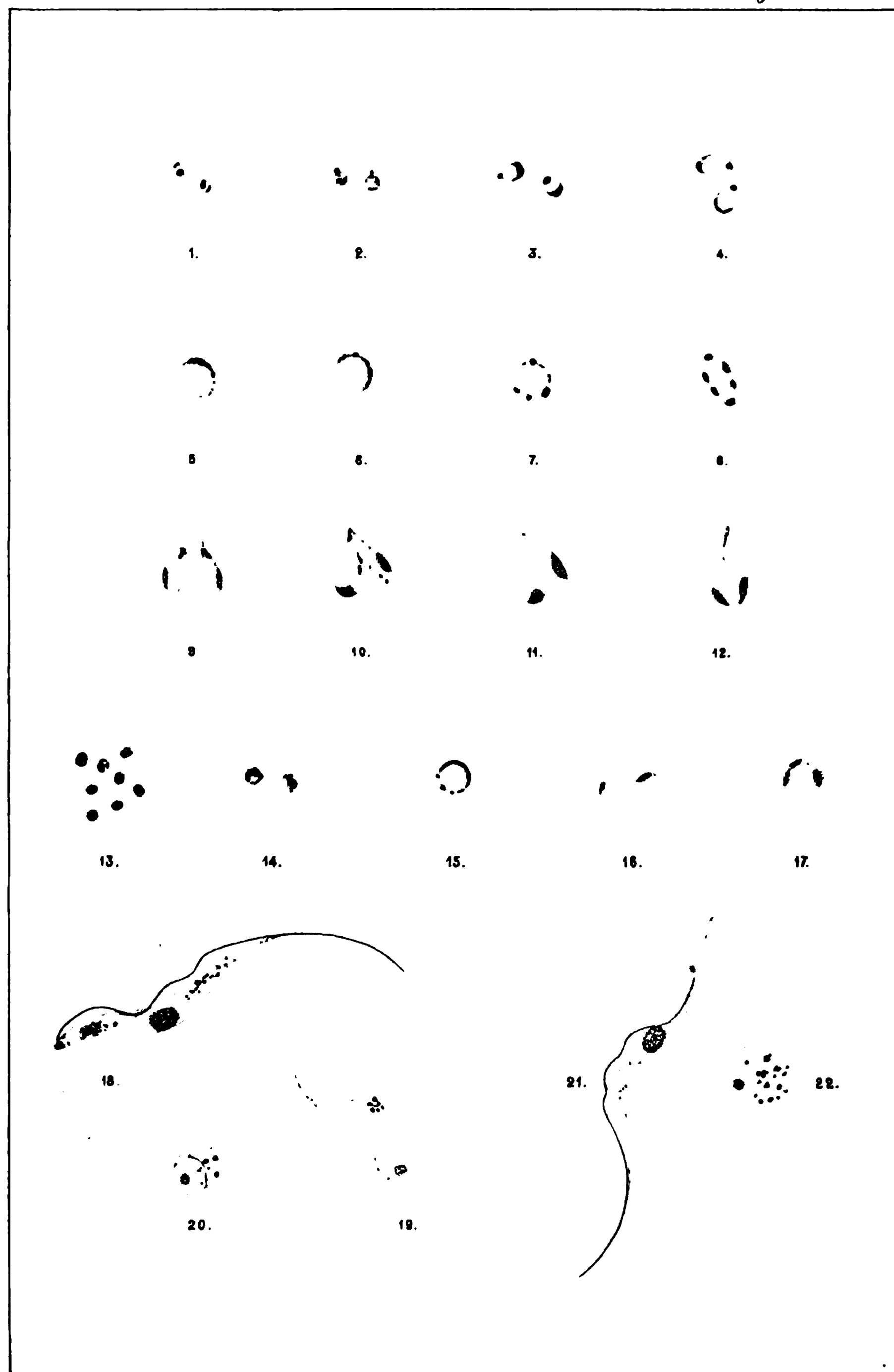
Fig. 20 — Forma rotonda.

Fig. 21-22 — Tripanosoma riscontrato in un caso di « malattia del sonno » nel bue.

I preparati sono stati colorati con il metodo Romanowski.

Annali d'Igiene sperimentale (Nuova serie)
Vol. XV - Tav. 1.

Memmo-Martoglio-Adani



E. Battisti lit. Roma - Via Depretis 92.

Memmo dis.



ISTITUTO SIERO-VACCINOGENO ERITREO
MISSIONE PER LO STUDIO DELLE MALATTIE DIFFUSIBILI IN ERITREA

La peste equina

per il dott. MEMMO GIOVANNI.

La *peste equina* è una malattia conosciuta finora nel Sud Africa e denominata *perreziekte* (boero), *paardenziekte* (olandese) od *horse-sickness;* e sebbene questi nomi altro non significhino che *malattia dei cavalli*, tuttavia con essi s'intende designare una speciale malattia, la quale colpisce principalmente i cavalli.

Nella Colonia Eritrea occorre negli equini una malattia, chiamata col nome vago di *tifo climatico:* noi abbiamo rivolto ad essa la nostra attenzione per i danni rilevanti che la malattia ha prodotto durante le nostre spedizioni e per l'alta importanza che ha in Colonia pei servizi di trasporto, sia in tempi normali, sia nel caso di spostamenti di grosse masse di truppe.

Le nostre osservazioni e le nostre ricerche ci hanno condotto ad identificare la malattia con la *horse-sickness* o peste equina: e crediamo utile riassumere quanto si conosce sulla malattia, riferendoci specialmente ai lavori dei ricercatori nel Sud Africa, Theiler (1) ed Edington (2).

Già nel 1780 e più tardi, rapporti di coloni olandesi parlavano nel Sud Africa di una *paarden* o *perreziekte*, ma alla malattia fu data maggiore attenzione solo verso la metà del XIX secolo. Nel 1854-55 essa si manifestò in modo allarmante, cagionando la perdita di oltre 64,000 animali nella Colonia del Capo, la quale è pur piccola parte dell'Africa del Sud. Nel Natal apparve grave nel 1887 e di nuovo nel 1891-92, nel qual tempo si diffuse fieramente in tutta l'Africa Australe. Essa è stata constatata dal Theiler nel Transvaal, Natal, Matabeleland, Betschuanenland: appare anche in certi distretti della Colonia del Capo e nei possedimenti tedeschi e portoghesi.

Il primo studio fatto nel 1881 dal colonnello veterinario Lambert (3) concluse per la sua identità con il carbonchio. Nel 1887 il maggiore veterinario Nunn (4) nel Natal, per incarico della reggenza inglese, riconosce, per l'esame del sangue e per i risultati delle inoculazioni, che non si tratta di carbonchio, e, senza pronunciarsi direttamente sulla natura della infezione, inclina ad ammettere una origine malarica.

Edington, nella Colonia del Capo, ha studiato la malattia sperimentalmente fin dal 1892, e i suoi risultati sono riuniti nel suo *Jahresbericht*. Le sue osservazioni furono ritenute come fonte principale dai veterinari e dagli altri autori sulle zoonosi sud-africane.

Nel 1893 il Theiler (5) dà una buona descrizione clinica della peste.

Nel 1895 il Sander ritorna nell'errore del Lambert, ammettendo il carbonchio; ma, forse per fatale coincidenza, raccolse il materiale d'esame su animali carbonchiosi.

Nel 1895 Rickmann (7) e Hayes (8) poco aggiungono ai dati già acquisiti sulla patologia della peste.

Nel 1900 il Rickmann (9) trova che il filtrato allo Chamberland rimane inattivo; e descrive, nell'interno dei globuli rossi, dei parassiti che crede poter paragonare alla malaria perniciosa dell'uomo.

Nel 1900 e nel 1901 Mac Fadyean (10) e Nocard (11) constatarono la filtrabilità del virus attraverso le candele Chamberland e Berkefeld.

Nel 1901 appaiono due lavori completi di Edington (2) e di Theiler (1).

La natura della malattia sembrava così nettamente stabilita, quando in quest'anno l'Edington (12) modifica in parte le sue vedute e viene a confondere il concetto della peste equina, parlando di una *malarial form of south African Horse sickness*. Egli ammette che se si inoculano con sangue virulento di peste equina animali naturalmente poco suscettivi alla malattia (asini, buoi, capre), o animali, che dopo un primo attacco hanno acquistato immunità, il sangue di questi animali è poi capace di trasmettere una infezione modificata, che è *malarica nel tipo*, e questa infezione è associata con la presenza di parassiti nel globulo rosso. Non sappiamo per quale ragione l'Edington non faccia una entità morbosa a sè della malattia riscontrata e non parli di *piroplasmosi equina*, separandola nettamente dalla peste equina. Nel sangue dei cavalli, si trova spesso un ematozoo intraglobulare, già stato rilevato nel 1897 dal Guglielmi di Castellaneta (Lecce) e poi nel 1898 da Bordet e Danysz nell'Africa del Sud. La piroplasmosi equina è enzootica in tutta l'Africa del Sud: è stata studiata nel Natal e nella Colonia del Capo. Theiler (13) l'ha osservata in differenti regioni dei Transvaal e sopratutto in Pretoria, in cavalli provenienti dal Basutoland e da Vrij-Staat. Il Laveran (14) osserva che la peste equina è indipendente dalla piroplasmosi equina, ma che le due malattie possono coesistere, e coesistono in particolar modo assai spesso nei cavalli del Transvaal. Noi sappiamo inoltre che le piroplasmosi in genere possono rimanere talora latenti ed essere rilevate solo quando intervenga un'altra infezione acuta, così come Nicolle e Adil Bey hanno osservato in Turchia (15), e noi stessi (16) nell'Eritrea abbiamo potuto constatare per la peste bovina, la quale rende evidente la piroplasmosi latente nei buoi. Le stesse relazioni potrebbero verificarsi tra la peste equina e la piroplasmosi equina, tenendo conto che, come la peste equina, anche la peste bovina è data da un virus filtrabile.

***

Secondo le relazioni dei veterinari inglesi nella campagna del 1868, degli egiziani nel 1875 e quelle di molti viaggiatori e di individui che soggiornarono lungo tempo in Abissinia, nei Bogos, a Cheren e a Massaua, si può ritenere che la peste equina esista da lungo tempo nella Colonia Eritrea: gli indigeni la chiamano col nome di *mendèf*. Con l'occupazione italiana coincise l'insorgere di una grave epizoozia, resa più facile nei quadrupedi importati dalle fatiche e dalle condizioni igieniche poco osservate a causa delle esigenze tattiche. I pareri dei veterinari militari furono allora discordi e si ripeterono gli errori già avvenuti nel Sud Africa. Alcuni ammisero una infezione carbonchiosa (Adani) (17): altri un tifo intenso dovuto alle speciali condizioni di clima e di località (Botallo) (18): altri febbre tifoidea (Conti) (19), o tifo equino (Plassio) (20).

Attualmente nell'incertezza della diagnosi si adopera in Colonia il nome di *tifo climatico*, che non ha alcun valore nè dal lato etiologico, nè dal lato clinico, nè dal lato anatomo-patologico. Il capitano Giannini (comunicazione orale) ammette, per le osservazioni cliniche, che possa trattarsi di paludismo. Noi crediamo che sotto il nome generale di tifo climatico probabilmente si possa talora nascondere anche la piroplasmosi equina, data la presenza da noi constatata della piroplasmosi nei bovini, nei cani e nelle pecore in Eritrea; la descrizione clinica, poi, e il reperto anatomo-patologico dato dal dott. Plassio, ricordano talora molto la piroplasmosi del cavallo. Nei casi però da noi studiati non abbiamo mai osservato nel sangue e negli organi degli animali malati il piroplasma equino: e quindi *con il nome di peste equina intendiamo riferirci alla malattia degli equini, prodotta da un virus filtrabile.*

Il tenente veterinario Adani riporta le sue osservazioni sulla grave epizoozia manifestatasi nei primi del 1888 nei quadrupedi del corpo di spedizione. Il primo caso si osservò verso la fine di dicembre 1887 in un cavallo appartenente alla prima batteria da campagna del corpo speciale accampato ad Otumlo. Successivamente i casi si moltiplicarono, prendendo proporzioni allarmanti, anche nei muli e nei cavalli dei circostanti accampamenti fino al Piano delle Scimmie. E allorchè le nostre truppe si spinsero il 2 febbraio 1888 all'occupazione di Sahati, il morbo cominciò a infierire a tal segno, che per oltre un mese si ebbe a lamentare la perdita di 15 a 20 equini al giorno. Contemporaneamente l'epizoozia dominava negli accampamenti di Sahati e Otumlo, ove il secondo squadrone di cavalleria, della forza di 141

cavalli, ebbe 114 malati e ne perdette oltre 76 (Plassio). Sopra circa 3000 equini, addetti ai nostri servizi in Africa, ne morirono in pochi mesi circa 800, la maggior parte per l'epizoozia.

La malattia in Colonia ([1]) è attualmente localizzata nelle parti basse e nella zona media; essa segue alcune vallate poste ad altezze superiori alle medie, ove si verificano speciali condizioni climatologiche. La piana di Sabarguma e Ghinda sembrano le regioni preferite, e così le grandi valli che vanno al Sudan; tutta la valle del Gasc, del Mareb (fino a 1200 metri): la valle tutta del Barca, il basso Anseba e tutto il Saamar. Anche nel Sud-Africa la malattia sembra legata all'*altitudine*; i distretti giacenti in alto (*hoogveldes*) sono relativamente immuni, mentre i cosiddetti *laagveldes* sono quasi inabitabili per i cavalli.

Ciò appare evidente, per esempio, tra Pretoria e Johannesburg; questa ultima città, che giace sopra 1860 metri sul livello del mare, non conosce per così dire la malattia, la quale infierisce invece annualmente in Pretoria a 930 metri e a Potchefstroom. Nel Natal sono per la maggior parte i distretti della costa, ove a malapena si possono tenere i cavalli; mentre i distretti di Mooirjvers e i pendii di Drakens-berge sono le regioni particolarmente produttrici di cavalli. Tuttavia se l'immunità di una regione e l'elevazione sul livello del mare sono legate fra loro nella maggior parte dei casi, vi sono nel Transvaal distretti, i quali, malgrado l'elevata altitudine, non sono risparmiati dalla peste; Leidenberg, per esempio, a 1800 metri, ogni anno lamenta perdite di cavalli.

Riguardo all'influenza delle *stagioni*, sebbene si possano osservare casi isolati in tutti i mesi dell'anno, tuttavia la malattia si sviluppa a preferenza all'epoca delle pioggie e per lo più sul finire di esse.

Lo stesso si verifica nel Transvaal: durante l'epoca della siccità (inverno), la quale dura ivi dal maggio all'ottobre, la malattia non si riscontra che eccezionalmente, mentre nell'epoca delle pioggie, dal gennaio al marzo (estate), la peste appare regolarmente e frequentissima.

Vi devono poi essere determinate condizioni telluriche e climatiche necessarie allo svilupparsi della malattia, e queste condizioni si riferiscono sopratutto all'*umidità* e alla *temperatura*. Questi rapporti ci fanno comprendere perchè in certi anni la malattia appaia

([1]) Il Commissario regionale di Cheren, capitano Fioccardi, si è occupato sempre con zelo e con intelligenza della questione; dobbiamo alla sua cortesia parecchie informazioni.

con caratteri più gravi, in altri meno. Così, per esempio, in Eritrea, ad Agordat, località favorevole al manifestarsi dell'infezione, si possono avere periodi di uno o due anni, nei quali la malattia non appare: ciò forse in rapporto con la scarsezza delle pioggie in quei dati anni.

Il Theiler osserva nel Sud-Africa che quanto più precoce e violenta si presenta una stagione di piogge, altrettanto si può ritenere più precoce e grave sarà la peste.

Così nel 1892 in Pretoria la quantità della pioggia caduta dal gennaio alla prima settimana di aprile raggiunse i mm. 277: pochi casi si osservarono della malattia; nell'anno seguente fu di mm. 551 e l'epizoozia apparve fiera; le perdite in quell'anno furono enormi, e fu osservata la malattia anche in distretti dove, a memoria d'uomo, non si conosceva.

La peste si spegne non appena entra la stagione fredda, ciò che coincide con la scomparsa delle piogge, e per i boeri è regola generale che 8 giorni dopo la prima gelata comincia il tempo immune, ciò che a Pretoria e dintorni appare verso la metà di maggio.

Sembra inoltre che vi debbano essere *altre circostanze, le quali dispongono gli animali alla malattia*. Secondo le osservazioni e l'esperienza dei boeri, un animale può ammalare nella stagione pestosa o perchè esposto all'aria notturna, o perchè messo al pascolo nei campi rugiadosi. Da ciò la precauzione, raccomandata fin dal 1856 da una Commissione inviata nel Transvaal dalla Colonia del Capo, di tenere gli animali chiusi di notte e di mandarli al pascolo, solo quando il sole ha fatto dileguare la rugiada. È certo che gli animali tenuti riparati in buone stalle sono meno esposti ad ammalare, e questo il Theiler ha potuto constatare, sebbene non come regola assoluta, in Pretoria. La credenza poi, che le erbe bagnate possano dar luogo alla malattia, può spiegarsi col fatto che appunto negli anni, nei quali vi sono più ammalati, vi è anche maggiore umidità.

Decorso clinico - Sintomatologia. — *L'incubazione* della malattia varia da 1 a 8-9 giorni, e nell'infezione sperimentale la durata dell'incubazione dipende dalla virulenza del virus, e non sempre, dalla quantità di virus inoculato.

Riguardo al decorso clinico i boeri distinguono due forme della malattia: la *dikkopziekte*, nella quale sintoma caratteristico è il rigonfiamento della testa dell'animale malato, e la *dunpaardenziekte*, nella quale non vi sono localizzazioni esterne. Il Theiler, per le sue osser-

vazioni sulla malattia spontanea e sperimentale, distingue le seguenti forme cliniche:

1. *Forma iperacuta* o *forma setticoemica.*
2. *Forma acuta* o *dunkop* o *forma polmonare.*
3. *Forma subacuta* o *dikkop* o *forma cardiaca.*
4. *Forma cronica* o *forma atipica.*

Nella *forma iperacuta* l'incubazione è brevissima, e talora la malattia si riconosce solo poche ore prima della morte: non di rado succede che animali, all'apparenza sani, muoiono appena cominciano a lavorare.

La curva tipica febbrile di una forma iperacuta mostra un aumento graduale e giornaliero della febbre, la quale può arrivare a 41° e anche più.

Talora manca qualunque altro sintomo.

Nelle forme sperimentali si può riconoscere come per qualche giorno, malgrado l'alta temperatura, l'animale non perda l'appetito, sia vivace e presenti le congiuntive normali o solo lievemente iperemiche. Appaiono poi subitamente sintomi gravi: il polso sale a 60, 80 e più in poche ore: la respirazione diviene più frequente, 20-30 atti al minuto: il murmure respiratorio si conserva normale. Non raramente l'animale si corica in terra e presenta disturbi, come se colpito da lieve colica. Rapidamente si manifestano tremori muscolari generali: barcollamenti e improvvise cadute dell'animale con convulsioni: la morte sopravviene in breve tempo, con emissione di abbondante liquido spumoso dalle narici e dalla bocca. Tutto questo quadro si può svolgere da mezz'ora a 4-6 ore: la malattia può durare al massimo 4-6 giorni. Questa forma iperacuta è sempre mortale.

La *forma acuta* o *forma polmonare* ha una incubazione e un periodo prodromico più lungo.

La curva febbrile non si differenzia da quella della forma iperacuta: la temperatura sale lentamente, a gradi, a 40°, 41°, con larghe remissioni, fino a 38°, al mattino: raramente si innalza bruscamente e si mantiene continua.

I prodromi durano alcuni giorni e possono nella pratica passare inosservati. La febbre può essere presente da qualche giorno, mentre l'animale ancora lavora, e nessun sintoma ne rivela lo stato morboso. Poi appaiono, per lo più verso sera, evidenti i sintomi della malattia. Lo stato generale si modifica: l'animale si abbatte, l'attività cardiaca aumenta di frequenza, da 40 sale fino a 80 battiti al minuto, il polso si mantiene pieno e forte nei primi momenti, ma con l'aumentare della frequenza diviene piccolo, debole, sottile, tanto che non si arriva più a percepire. Si manifestano poi i disturbi dell'apparecchio respiratorio; il respiro diviene più frequente e più superficiale, con tipo prevalentemente addominale. Appare evidente la difficoltà del respiro e l'attività dei muscoli intercostali: l'animale tiene la testa e il collo distesi, e apre largamente le narici. All'esame obbiettivo si percepiscono rantoli, ronchi e sibili, e nella parete toracica anteriore si rileva fenomeno di gorgoglio, per la presenza di liquido nei grossi bronchi. Appaiono colpi di tosse, che l'animale cerca di reprimere, ma che poi aumentano di frequenza, e dalle narici e dalla bocca scorre un liquido spumoso bianco o bianco rossastro. Nell'ultimo periodo l'animale barcolla: la dispnea è intensa: il torace è dilatato e immobile, mentre i fianchi sono agitati da mo-

vimenti ondulanti, appena percepibili: poi il malato cade in terra e muore tra convulsioni generali.

Vi sono altri sintomi più o meno costanti: uno fra questi è l'iperemia e le emorragie nelle congiuntive, accompagnate in qualche caso da secrezione lacrimale purulenta.

Dalla comparsa del quadro clinico completo, la malattia si svolge in 1-3 giorni. Non ha sempre esito mortale e si verifica la guarigione nel 43.5 °/₀ dei casi. La convalescenza è però lunga: la temperatura dopo 5-8 giorni torna al normale e scompaiono lentamente i sintomi morbosi: permane per più tempo uno stato di debolezza e di atonia generale.

Nella *forma subacuta* o *forma cardiaca* o *forma edematosa*, l'incubazione è in media di 6 giorni, e tutto il decorso della malattia è più lungo.

Come nelle forme precedenti, non appare dapprima alcun sintoma: la temperatura s'innalza lentamente. Dopo 1-3 giorni dacchè la temperatura ha raggiunto il massimo, appaiono i primi fatti visibili. Prima di tutto si osservano emorragie sottocongiuntivali, le quali possono confluire tra loro. Appare poi una tumefazione delle cavità sopraorbitarie, alla quale si associa un sollevamento dei muscoli temporali; l'occhio assume un aspetto tipico per l'edema dei contorni oculari e sembra quasi sporgere dalla cavità orbitaria. L'edema si può estendere a tutta la testa e anche al collo e al tronco. Il respiro può mantenersi normale o aumentare di frequenza, verso la fine della malattia, con tipo costo-addominale.

Costante sintoma è la debolezza muscolare, la quale appare precocemente: l'animale ha andatura vacillante e si corica facilmente in terra: talora non è più capace di sollevarsi. Non raramente appaiono sintomi di colica, difficilmente rilevabili talora, per la debolezza dell'animale.

Nei casi letali la temperatura cade rapidamente sotto al normale e l'animale muore, senza presentare le violenti manifestazioni convulsive come nella forma acuta.

In rarissimi casi le lesioni sembrano localizzarsi nella cavità boccale: la mucosa diviene turgida e, per una stasi generale, si colora spesso in bleu, fino ad assumere una tinta livida: questa forma è detta *blauwtongue*.

La guarigione avviene nel 56.5 °/₀ dei casi. La temperatura torna al normale: le forze si sollevano e gli edemi dopo 5-8 giorni dalla defervescenza febbrile non sono più riconoscibili. L'animale però non può prestar servizio prima di 6 settimane.

Il Theiler ammette anche una *forma cronica atipica*, che però non ha osservato, o almeno non ha riconosciuto, nella infezione naturale. La curva della temperatura è atipica e può tornare al normale per più giorni. Manca qualunque sintoma per poter fare una diagnosi clinica; tuttavia l'inoculazione del sangue ha dato sempre una forma acuta o subacuta negli animali inoculati. La morte avviene, ricordando la forma acuta o subacuta per la notevole debolezza e prostrazione delle forze, malgrado l'assenza di edemi.

La distinzione in queste forme cliniche non è naturalmente assoluta: si possono verificare tutta una serie di casi intermedi, i quali si avvicinano più all'una o all'altra delle forme descritte. Con lo stesso virus e con la stessa dose si possono avere le varie forme

cliniche della malattia, in rapporto probabilmente con la diversa resistenza degli animali e degli organi di uno stesso animale.

Nella Colonia Eritrea, nella grave epizoozia manifestatasi all'epoca della occupazione italiana, dalla descrizione clinica fatta dall'Adani sopra un centinaio di casi studiati, possiamo ritenere che la forma predominante nei quadrupedi fosse la forma acuta con l'edema polmonare nella maggior parte dei casi. Non mancarono però casi di forma iperacuta rapidamente mortale e casi della forma subacuta con lesioni delle congiuntive ed edemi sopraorbitari.

Nei casi da noi esaminati (cavalli e muli), abbiamo riscontrato la forma acuta e subacuta della malattia: un solo caso ci si è presentato di forma acutissima, nel quale l'animale è morto in 24 ore.

Nulla abbiamo da aggiungere dal lato clinico alla descrizione così esatta data dal Theiler. La temperatura negli animali malati sale per gradi e si mantiene elevata oltre i 41°, con remissioni mattutine fino a 38°. Nella forma acuta della malattia si imponevano i disturbi a carico delle vie respiratorie, con i segni di edema polmonare e gravi sintomi nervosi: nella forma subacuta evidenti erano l'edema delle cavità sopraorbitarie e le emorragie sottocongiuntivali, talora confluenti.

Il decorso della malattia è stato in media di 5-6 giorni.

Anatomia patologica. — Il Theiler crede che corrispondentemente alle forme cliniche si possa fare una distinzione anatomo-patologica; tuttavia le lesioni sono così varie che sarebbe difficile fare una diagnosi differenziale anatomo-patologica: in qualche caso anzi manca qualsiasi alterazione.

All'autopsia noi abbiamo rilevato emorragie sottocongiuntivali di varia dimensione, in qualche caso confluenti, in ambedue gli occhi: nella forma iperacuta abbiamo osservato anche emorragie sottocutanee e cutanee, da una testa di spillo fino alle dimensioni di una moneta da due centesimi. Nel connettivo sottocutaneo, specie nella forma subacuta o edematosa della malattia, si rileva una infiltrazione gelatinosa gialliccia, localizzata specialmente attorno al collo e alle giugulari, o sui lati dell'addome. Nelle cavità sopraorbitarie il carattere edematoso non è così visibile: sembra qui che tutto il tessuto sia egualmente infiltrato, e non raramente si riscontrano piccole emorragie puntiformi. Le glandole linfatiche sono rigonfie, alquanto molli.

Nella cavità addominale si riscontra abbondante liquido citrino: il fegato è congesto, di colore scuro, con piccole emorragie puntiformi, sottocapsulari: talora ha l'aspetto del fegato cardiaco.

La milza è alquanto ingrandita di volume, con emorragie sotto la capsula; in qualche caso è un po' rammollita.

Nel sistema digerente abbiamo riscontrato emorragie sottomucose di varia

grandezza, disseminate in vari tratti del tenue: nel crasso un po' di edema sottomucoso.

Secondo Theiler, i reni sarebbero normali o presenterebbero un rigonfiamento dei glomeruli di Malpighi: nelle nostre osservazioni i reni erano aumentati di volume, iperemici e presentavano in un caso gravissime emorragie nella porzione corticale.

La vescica ha emorragie sottomucose: l'urina è densa, filante, di colore oscuro.

Nella cavità toracica abbiamo riscontrato i polmoni distesi, enfisematosi, con emorragie interstiziali: scarso edema gelatinoso nelle cavità pleuriche: le pleure per lo più apparivano normali. Vi era edema nella trachea e nei bronchi.

Nel pericardio si riscontra liquido sieroso citrino: il cuore aumentato di volume in diastole, con coaguli gialli, presenta emorragie di varia dimensione sottoepicardiche e nell'endocardio, a livello dei pilastri e delle valvole auricoloventricolari.

Riferiamo l'esame microscopico di un caso: i pezzi di organo per l'esame isto-patologico sono stati fissati in liquido di Müller, e le sezioni in paraffina sono state colorate con diversi metodi di colorazione (emallume, ematossilina-eosina) (1).

Nelle *glandole linfatiche* i follicoli linfatici sono distinti, di volume pressochè normale: il tessuto reticolare citogeno perifollicolare e dell'ilo della glandola, in corrispondenza dei seni linfatici, appare quasi dissociato con numerosi elementi rotondeggianti, della grandezza di 6 a 8 linfociti, mononucleati, con nucleo rotondo, la maggior parte dei quali sono carichi di pigmento emosiderinico.

Della struttura della *milza* non sono più riconoscibili che le grosse trabecole: il rimanente della struttura dell'organo appare distrutto da gravi e diffuse infiltrazioni emorragiche.

Al sangue stravasato si vedono commisti i linfociti della polpa, raccolti nei punti corrispondenti ai follicoli in accumuli maggiori, e numerose cellule grosse, mononucleate, rigonfie, cariche di pigmento emosiderinico.

La struttura grossolana del *fegato* è ancora riconoscibile in alcuni punti, anzi in questi la forma dei lobuli appare più distinta per una ricca infiltrazione parvicellulare degli spazii triangolari e del connettivo interlobulare, infiltrazione che si diffonde anche nell'interno dei lobuli fino alle venule centrali. L'infiltrazione negli spazi triangolari è prevalente attorno ai vasi sanguigni e biliari: l'epitelio di rivestimento di questi ultimi in alcuni tratti è conservato, in altri distrutto. Nei punti nei quali la struttura del fegato è ancora riconoscibile, le cellule epatiche presentano alterazioni parenchimatose di vario grado e hanno i nuclei pallidamente colorati, il protoplasma torbido e ripieno di minutissimi granuli di pigmento ocraceo. In altri punti la struttura del fegato non è più riconoscibile per una necrosi diffusa, che ne ha colpito tutti gli elementi costitutivi. In queste chiazze necrotiche non si riconoscono che pallidissimi avanzi di nuclei, colorati dall'eosina, e i residui

(1) L'esame è stato fatto nell'Istituto di anatomia patologica della Regia Università di Roma, diretto dal prof. Marchiafava, con l'aiuto del dott. Nazari.

delle cellule epatiche conservano ancora i granuli di pigmento ocraceo, descritto nelle altre parti.

Nei *reni* si rileva una gravissima iperemia con enorme dilatazione dei vasi sanguigni e capillari, i quali appaiono ripieni di sangue. Vi sono alterazioni parenchimatose e necrosi dell'epitelio dei tubi uriniferi contorti, il cui lume dilatato è occupato da una sostanza omogenea in connessione con le cellule epiteliali, la quale appare senza struttura, disposta a grosse maglie ed ha l'aspetto di una sostanza coagulata.

Nei *polmoni* si constata notevole iperemia con dilatazione dei capillari sanguigni, i quali sporgono nell'interno delle cavità alveolari. In alcuni punti gli alveoli appaiono ripieni di corpuscoli rossi stravasati e di un detritus tenue, ora granulare, ora d'aspetto reticolato.

La struttura del *cuore* non appare molto netta: nello spessore del miocardio si notano piccoli focolai emorragici.

In alcuni tratti del *tenue* abbiamo riscontrato una desquamazione dell'epitelio di rivestimento e una ricca infiltrazione parvicellulare dello strato glandolare della mucosa con alterazioni di vario grado: atrofia e scomparsa dei tubi glandolari della medesima.

Nel *crasso* si osserva edema della sottomucosa: infiltrazione parvicellulare dello strato glandolare della mucosa con chiazze di necrosi: desquamazione e caduta dell'epitelio di rivestimento.

Recettività. — Sono suscettivi in massimo grado alla malattia i cavalli e i muli.

L'asino sembra più resistente; nell'infezione sperimentale si ha una febbre, la quale nel carattere e nel decorso si rassomiglia alla peste equina, senza altri sintomi.

Il sangue, tolto durante il periodo acuto della malattia dagli asini, dà nei cavalli una tipica malattia mortale.

Nella Colonia Eritrea cavalli e muli sono molto sensibili; potremmo classificare gli animali nel seguente ordine, dai più suscettivi ai meno: cavallo arabo, cavallo italiano, mulo italiano, cavallo abissino, cavallo dongolo, mulo abissino, asino.

Come nel Sud Africa si può ritenere che gli animali importati sono i meno resistenti; infatti l'Adani nell'epizoozia del 1888 osservò che la malattia si manifestò prima e con maggior violenza nei cavalli italiani importati e poi negli abissini.

La zebra e il quagga sarebbero suscettivi, secondo il Rickmann, immuni invece secondo il Theiler.

Il Theiler esclude poi assolutamente che la malattia si possa trasmettere nei buoi, nelle razze ovine, nei maiali, cani, gatti, galline, anatre, colombi, conigli, cavie, ratti e topi.

Secondo le nostre osservazioni le capre, le pecore, i cani e le cavie sono immuni.

Edington afferma di aver trasmesso la malattia nei bovini e sopra 21 animali avrebbe avuto in 7 reazione febbrile e in 4 la morte; ammette pure una recettività diversa delle capre e delle pecore, ma non sapremmo quale valore dare a queste sue affermazioni. Egli dice (21) che si può trasmettere alle capre la peste equina; e che il virus *acclimatato* (?) nelle capre, produce in questi animali una malattia virulenta, la quale non si distingue dalla malattia enzootica nelle razze ovine del Sud Africa, nota come « heart-water ». Noi sappiamo che l'heart-water altro non è se non una piroplasmosi, trasmessa dalla puntura di una zecca, l'*amblyomma hebraeum* (Koch).

Immunità. — Il Theiler per propria esperienza non crede che vi sia una immunità congenita verso la peste nella razza equina: si verifica solo una maggiore o minore resistenza, più notevole negli animali nativi che negli animali importati.

Gli animali che hanno superato la malattia acquistano un certo grado di immunità, ma questa non è permanente.

Questi animali sono detti dai boeri *gezonten paarden*, nome impiegato anche dai tedeschi, *gesalzenen Pferden*, e dagli inglesi, *salted horses*. Per i boeri il cavallo, il quale ha avuto la forma subacuta o edematosa della malattia, è certamente immune, mentre invece il cavallo, il quale ha avuto la forma clinica acuta o polmonare, è ancora suscettivo di contrarre una forma subacuta e morirne. Ammettono inoltre che animali immuni rispetto a una regione non lo siano per le altre.

Il Theiler, sperimentalmente, inoculando con virus pestoso o esponendo al contagio naturale diverse serie di animali, i quali avevano superato la malattia da un tempo più o meno lungo (da 4 mesi a più anni), ha constatato che si ha certamente un certo grado di immunità dopo un primo attacco della malattia; nel secondo attacco, o nell'inoculazione sperimentale, si ha spesso in questi animali una forma mite della peste equina.

Su 18 cavalli, i quali avevano già superato l'infezione e furono esposti in località gravemente infetta, si verificarono 6 malati con due morti.

Nella Colonia Eritrea si sa che l'aver superato la peste equina non rende i quadrupedi affatto immuni da ricadute, le quali possono avere anche esito letale.

Diagnosi. — Se la diagnosi della malattia è facile nei tempi di epizoozia, prendendo in esame l'anamnesi, la stagione, le località infette, può avvenire che sia difficile riconoscere casi isolati nei

periodi di tempo liberi dalla malattia. Come del resto nel Sud Africa nell'epoca della peste equina tutti i casi di malattia, che non si possono diagnosticare, sono peste (Theiler), così anche nella Colonia Eritrea molto facilmente si ammette la diagnosi di tifo climatico.

Nella peste equina la diagnosi è tanto più facile quanto più avanzato è il decorso della malattia. All'inizio non vi è che l'elevazione della temperatura, la quale si mantiene per qualche giorno senza che l'animale mostri alcun segno morboso. A questo proposito il Theiler descrive una *febbre effimera* dei cavalli nel Sud Africa, la quale si accende subitamente, si mantiene continua, raggiungendo anche i 42°, per alcuni giorni, e si perde poi per lisi. È sorprendente che malgrado l'alta temperatura gli animali non presentano alcun sintoma di malattia e che questa non lascia in loro alcun seguito. Si differenzia questa forma febbrile dalla peste equina, perchè non è mai mortale e perchè animali immuni contro l'effimera non lo sono affatto contro la peste; anzi le due infezioni possono coesistere. Ha trovato poi il Theiler altre forme febbrili non diagnosticabili: in un caso ha riscontrato una *filaria papillosa* nell'addome dell'equino: in un altro un parassita nel sangue, dell'aspetto dello *spirochete* di *Obermeyer*, con sei regolari spire.

Delle forme cliniche ammesse dal Theiler nella peste equina la forma subacuta è quella che si può più facilmente riconoscere per la presenza degli edemi, anche se localizzati solo nelle cavità sopraorbitarie, e per lesioni emorragiche nelle congiuntive.

La forma acuta può nell'inizio fa pensare a una polmonite, per i sintomi che appaiono a carico dell'apparecchio respiratorio; ma, in seguito, l'emissione abbondante di liquido spumoso dalle nari e dalla bocca, le alterazioni del cuore e del polso, l'adinamia profonda varranno a modificare la diagnosi.

Quanto alla piroplasmosi equina sappiamo che comincia con febbre intensa e con i segni generali comuni a tutte le malattie acute. Però il segno caratteristico è la colorazione itterica delle mucose (pituitaria, mucosa boccale, mucosa dell'ano, vulva) e della sclerotica, la quale colorazione non si riscontra in nessun'altra infezione. La morte può avvenire rapidamente nel momento in cui la temperatura è più elevata: per lo più è preceduta da un periodo di collasso, con polso debole e filiforme e marcato polso venoso. Vi è costipazione che persiste o dà luogo a diarrea continua o intermittente con escrementi gialli. L'urina è rosso-scura per la presenza di emoglobina.

L'esame microscopico del sangue dimostra la presenza del piroplasma.

La forma iperacuta delle peste equina in pratica si può confondere con il colpo di sole.

Ricorderemo infine appena i rari casi di peste della forma subacuta con secrezione nasale, i quali si potrebbero scambiare con casi acuti di morva, specie quando ancora non siano presenti gli edemi del capo; nè ci sembra occorra parlare di una diagnosi differenziale con il carbonchio. Del resto, in un anno di permanenza in Colonia, non abbiamo osservato alcun caso di morva o di carbonchio negli animali.

Etiologia. — Trattasi com'è noto, d'un virus filtrabile.

Abbiamo già accennato che la prima ipotesi emessa sulla natura della malattia fu che si trattasse di carbonchio, ma il Nunn nei suoi studi escluse assolutamente l'affermazione del Lambert. Così pure Edington e Theiler ritengono che il Sander non abbia osservato casi di peste, ma animali malati di carbonchio, il quale non è assolutamente raro in certe regioni del Sud Africa.

Nel 1894 Edington ammise che la peste equina fosse data da un microrganismo della classe dei funghi e chiamò la malattia *edema-micosi:* e sotto questo nome per un certo tempo la peste apparve nella letteratura sulle epizozie del Sud Africa.

Il Theiler non ha mai riscontrato negli animali malati il fungo descritto da Edington: dice di aver trovato nei comuni ruscelli un germe, il quale si può ravvicinare a quello di Edington per i suoi caratteri morfologici, ma non ha alcuna azione patogena per gli animali. Il Theiler non è riuscito a ottenere alcun germe coltivabile con i comuni metodi di coltura. Nel suo lavoro pubblicato nel 1901 afferma come già da due anni egli avesse trovato che il siero di un cavallo, malato di peste, filtrato attraverso la candela Chamberland, dà ancora una malattia tipica.

Il Mac Fadyean però, nel 1900, pubblicava i risultati delle sue ricerche sul virus della peste equina. Egli ha filtrato la sierosità non diluita o un miscuglio di sangue e siero attraverso la candela Berkefeld e la Chamberland marca *F*, e ha ottenuto filtrati attivi. Inoltre anche la candela Chamberland marca *B* lascerebbe passare il virus, ma solo quando la sierosità sia stata diluita con 30 volumi di acqua. Quindi i germi della peste equina sarebbero più piccoli di quelli della peripneumonite e della febbre aftosa, i quali sono trattenuti dalla candela Chamberland marca *B*.

Per contrario il Nocard avrebbe ottenuto filtrati attivi solo con le candele Berkefeld.

Abbiamo già ricordato come la forma malarica della peste equina ammessa da Edington, sia legata alla presenza di un piroplasma nei globuli rossi.

Ripetuti esami microscopici e tentativi di cultura non ci hanno dimostrato la presenza di alcun germe nel sangue e negli organi degli animali da noi osservati.

In un caso abbiamo filtrato alla candela Chamberland, marca *F*, diluendolo con tre volumi di soluzione fisiologica, il sangue raccolto

poche ore prima della morte dalla giugulare di un cavallo, malato di peste equina. La candela adoperata era nuova, la pressione non ha raggiunto le due atmosfere; la durata della filtrazione non ha oltrepassato un'ora; la temperatura dell'ambiente oscillava intorno a 18°, le colture di controllo del filtrato sono state negative.

Abbiamo inoculato 10 cmc. del filtrato sotto cute ad un cavallo. L'animale, dopo una incubazione di cinque giorni, ha presentato il quadro tipico della peste equina, sotto forma subacuta: febbre oltre i 40°, con larghe remissioni mattutine; emorragie sottocongiuntivali in ambedue gli occhi: edema delle cavità sopraorbitarie: disturbi nella respirazione. La malattia non ha avuto esito letale e l'animale si è poi ristabilito.

Vie d'infezione. Resistenza del virus. — La peste equina non è una malattia contagiosa nel senso letterale della parola *contagio*. Un animale malato, le sue feci, le sue urine, i suoi prodotti morbosi non sono affatto sorgente di diffusione della malattia, e quindi anche i foraggi imbrattati non sono punto pericolosi. Ciò è dimostrato certamente. Un animale il quale da un distretto infetto si trasporti in un distretto sano non è capace di trasmettere la malattia, quando anche si ammali in mezzo a una mandria di animali. Il Fioccardi in Eritrea ricorda molti di questi casi: animali malati di peste equina pervenuti in zone, nelle quali abitualmente non alligna l'infezione, non hanno trasmesso per coabitazione la malattia ai quadrupedi. Noi stessi in Asmara abbiamo tenuto senza alcuna precauzione gli animali malati di peste a contatto di altri cavalli in esperimento e dei muli di servizio, senza dover lamentare il minimo incidente.

Il virus della peste equina si trova nel sangue degli animali malati, e, secondo Theiler, si troverebbe anche nei tessuti alterati. L'Edington ammette che possano essere virulentè le sierosità della trachea e del pericardio: ma, secondo Nocard, gli spandimenti delle sierose sarebbero inoffensivi.

Il sangue è infettante in qualunque periodo della malattia e sembra sia di eguale virulenza, tanto al principio di essa, quanto alla fine. Le inoculazioni sottocutanee, intravenose, intratracheali, intrapolmonari, hanno sempre esito certo; basta una dose di un decimo di centimetro cubo di sangue per uccidere certamente i cavalli; un centesimo di centimetro cubo non è sempre mortale.

È anche possibile, secondo Theiler, l'infezione per la bocca, ma occorrono allora forti quantità di sangue, 150 cmc.; con 100 cmc. non si ha alcun risultato.

Il plasma sanguigno conserverebbe a lungo la sua virulenza. Trattando il sangue con citrato di potassio al 10 % e separando il plasma, questo, con l'aggiunta di glicerina acquosa al 50 % e di acido fenico al 0. 25 % rimarrebbe attivo, secondo Edington, per due anni.

Il Theiler ha osservato che il sangue disseccato all'ombra perde la sua virulenza dopo 12-14 ore; secondo Edington invece, disseccato rapidamente in istrato sottile, ancora dopo due giorni darebbe negli animali una forma febbrile mite.

Riguardo all'azione della temperatura, tenuto a 45° il sangue conserva la sua virulenza per 6 giorni; le basse temperature non avrebbero alcuna influenza per settimane e per mesi. Resisterebbe infine il virus anche alla putrefazione; e, pur provocando degli ascessi, comunicherebbe la malattia.

La principale questione non ancora risoluta è come si presenti il virus nelle condizioni naturali, e come esso pervenga negli animali sani.

Abbiamo già veduto come il cavallo malato e i suoi prodotti morbosi non rappresentano una via di contagio diretto e come la produzione artificiale della malattia si può ottenere solo con l'inoculazione di sangue tolto dagli animali malati. L'osservazione del Theiler, riguardo alla trasmissione della malattia per le vie digerenti, dovrebbe far ammettere che nell'infezione naturale, qualora avvenisse per queste vie, il virus dovrebbe essere concentrato o in quantità enorme nei foraggi, perchè occorrono sperimentalmente 150 cmc. di sangue.

Non rimane quindi, secondo il Theiler, che una sola ipotesi: l'*infezione mediante insetti succhiatori di sangue*. Ammettendo questa ipotesi, pur non essendo ancora stato riconosciuto il genere e la specie dell'insetto, si possono spiegare facilmente le osservazioni epizoologiche. In ogni anno, in ogni stagione, in ogni tempo, quando ricorre la peste equina, il numero di questi insetti sarebbe al massimo, perchè le condizioni dell'ambiente e sopratutto l'umidità nelle regioni infette sarebbero le più favorevoli alla loro vita, ripetendosi quello che avviene per le zanzare nella trasmissione della malaria, per le zecche nella trasmissione delle piroplasmosi. Rimane però anche qui non risoluta la questione, come si conservi il virus nei periodi, nei quali l'epizoozia non esiste. Secondo il Theiler, il virus può conservare la sua virulenza allo stato umido per 14 mesi; quindi si potrebbe ammettere che nelle località umide trovi adatte condizioni alla sua conservazione, o anche che negli insetti trasmettitori della malattia possa, sotto forme più resistenti, conservarsi da un anno all'altro.

Cura e profilassi. — Numerosi mezzi curativi e preventivi sono stati tentati contro la peste equina, la quale arreca danni economici di non lieve momento; ma finora tutti i tentativi sono riusciti vani.

L'arsenico, i salassi, l'acido fenico, l'alcool a dosi generose, la china, i preparati iodici possono rappresentare una cura sintomatica, ma non hanno alcun effetto sul decorso della malattia.

Nel Sud-Africa in certe fattorie si dà ai cavalli il bulbo d'aglio, mescolato agli alimenti, e sembra con risultato.

Nell'Eritrea gli indigeni, per curare la malattia (e talora assicurasi con buon esito) pongono le radici di una certa pianta *coboroscið*, la quale cresce nel Mai Tzada Seraè, sopra carboni ardenti in una ciotola e fanno poi inspirare il fumo, che ne deriva, ai cavalli malati.

Dobbiamo ad Edington e a Theiler ricerche di ordine scientifico su tentativi di cura e immunizzazione degli animali, mediante l'uso di virus attenuati o di sieri.

Edington hà osservato che il sangue di animali i quali hanno avuto un decorso della malattia superiore alla media, sembra di minore virulenza. Ha prelevato il sangue di animali infetti in una soluzione di citrato di potassio e l'ha tenuto a 39° per 10 giorni. Il virus così attenuato ha dato nei cavalli una reazione più o meno forte, e molto incostante, per la diversa suscettibilità dei cavalli. Un'attenuazione analoga sembra avvenire nell'organismo dell'asino; se si inoculano gli asini con sangue virulento di cavallo pestoso, gli animali hanno una forma febbrile, irregolare, con esito in guarigione. Il sangue prelevato da questi asini dopo 7 giorni uccide certamente i cavalli; dopo 10-11 giorni dà una febbre transitoria (la cosiddetta forma malarica dell'autore), o anche nessuna reazione.

Inoltre Edington ha sperimentato il siero di animali, i quali avevano superato naturalmente la malattia, e il siero di animali iperimmunizzati con dosi crescenti di sangue virulento, fino a 1000 cmc. Inoculando il siero solo o mescolato a sangue, i risultati sono stati completamente negativi: non si è osservato nel siero alcun potere curativo o immunizzante.

Le esperienze di Theiler concordano perfettamente con quelle di Edington. Nel maggio di quest'anno però, il Theiler (22) ha comunicato i risultati di nuove ricerche sull'uso del siero di cavalli iperimmunizzati contro la peste equina. Inoculando gli animali con un miscuglio di siero e di virus si produce una forma attenuata della malattia, la quale dura 12 giorni e lascia una immunità, che l'autore chiama passiva, della durata di 45 giorni. L'iniezione però del virus sotto forma di sangue esplica nell'animale vaccinato un certo potere emolitico, e la mortalità per la vaccinazione è del 10 %. Secondo il Theiler è preferibile inoculare il virus nella giugulare e il siero sotto cute: e facendo una seconda inoculazione di siero prima che si innalzi la temperatura, la reazione organica generale diminuisce. Occorrono però almeno 300 cmc. di siero per vaccinare un solo animale.

Da questi brevi cenni risulta evidente come *siamo ancora lontani da una soluzione pratica del problema:* e la difficoltà prima è nell'organismo animale, il quale nella peste equina non è atto ad acqui-

stare una immunità permanente o per lo meno di una certa durata, dopo un primo attacco della malattia.

Non rimane quindi allo stato attuale che ricorrere alle norme di polizia veterinaria generale. Gli animali malati, pur non rappresentando un contagio diretto devono essere allontanati dai sani nelle regioni nelle quali regna enzootica la malattia: e le carogne non devono essere abbandonate sul suolo e date in pasto alle iene, agli sciacalli, agli uccelli voraci e carnivori. Come profilassi, per ora, non rimane che seguire quello che l'esperienza insegna: tenere riparati durante la notte gli animali, ed impedire, per quanto è possibile, le punture degli insetti succhiatori di sangue.

Roma, novembre 1904.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Deutsche thierärztl. Wochenschrift, 1901, n. 20-24.
2. Centralbl. f. Bakt., 1901, p. 133.
3. *Horse Sickness or Antrax in South-Africa.* Brock 1881.
4. The veterinary Journal, 1888. p. 38.
5. Schweizer Archiv f. Thierheilkunde, 1893.
6. Archiv f. wiss. und prakt. Thierheilk, 1895, Bd. XXI.
7. Berliner tierärzt. Wochenschrift, 1895, n. 25.
8. The veterinary Journal, 1896.
9. Berliner tierärzt. Wochenschrift, 1900, n. 17.
10. Citato in Roux. *Les microbes dits invisibles.* Bull. Inst. Pasteur, 1903.
11. *Les maladies microbiennes des animaux.* Nocard et Leclainche, 1903.
12. The Journal of Hygiene, 1904.
The Journal of Trop. Medicine, 1904, 2 may.
13. Schweizer Archiv f. Thierheilkunde, 1901.
14. Société de biologie, 1901.
15. Annales Institut Pasteur, 1899.
16. Questi Annali, 1904.
17. Giornale di Veterinaria Militare, 30 giugno 1888.
18. Id., 30 aprile 1888.
19. Id., 31 agosto 1888.
20. Id., 31 ottobre 1889.
21. The Journal of Hygiene, 1903.
22. Revue gén. méd. vétér., 1 mai 1904, T. III.

niger v. Tiegh. e che risponde benissimo per molte specie di Ifomiceti. Il brodo si presta male per la coltura di alcuni Ifomiceti, ad es. dell'*Aspergillus fumigatus* Fres., come già ha fatto rilevare il Rénon (1), e come io stesso ho potuto constatare, non solo per questa specie ma anche, fino a un certo punto, per l'*Aspergillus flavus* Link (1); lo sviluppo del micelio è lento e scarso, e ancora più scarsa è la sporificazione. Le specie da me esaminate invece si sviluppano e sporificano tutte bene in *liquido di Raulin*. La coltura si può fare o nelle comuni provette o in Erlenmeyer o in capsule Petri; le più comode sono generalmente le provette, ma se con poco liquido si vuole avere uno sviluppo relativamente abbondante bisogna disporre il liquido in un sottile strato e mettere a disposizione dell'Ifomiceta una grande quantità d'aria, giacchè è noto che per lo sviluppo e più ancora per la sporificazione degli Ifomiceti in generale è necessario l'ossigeno; in tal caso saranno da preferirsi le capsule Petri. Un liquido colturale molto importante per le osservazioni cui può dar luogo è il *latte* sterilizzato, sia all'autoclave, sia, meglio ancora, col procedimento della sterilizzazione frazionata (per tre giorni consecutivi, al vapore circolante, per 20 minuti, mantenendolo negli intervalli a 20° C. circa). Quasi tutti gli Ifomiceti da me sperimentati danno sul latte sterilizzato, la cui reazione non sia stata corretta con l'aggiunta di acidi (2), uno sviluppo rigogliosissimo e quasi tutti producono successivamente due enzimi, di cui il primo ha la proprietà di coagulare il latte e l'altro di ridisciogliere il coagulo formatosi. Dopo un numero di giorni variabile col variare della specie che si coltiva, sotto al grosso feltro superficiale si vede galleggiare un po' di liquido (siero?), generalmente limpidissimo e gialliccio, talvolta un po' torbido, sotto al quale il coagulo è raccolto in forma di una massa biancastra grossolanamente polverulenta, che intorbida il liquido separato se si agita la provetta. Avvenuta la coagulazione, si osserva quasi sempre che nei giorni successivi lo spessore della massa coagulata va sempre più diminuendo, con rapidità maggiore o minore a seconda della specie e delle condizioni di coltura, e dopo qualche giorno tutto o quasi il coagulo è disciolto e sotto al feltro superficiale non si vede altro che un liquido generalmente un po' torbido e gialliccio, e raccolto sul fondo della provetta un po' di deposito. La coagulazione e più ancora la dissoluzione del coagulo si compiono più rapidamente e più completamente se si adopera latte previamente scremato, e se, quando si è formato il feltro superficiale formante come una specie di tappo a chiusura perfetta, si ha cura di distaccarlo dalle pareti della provetta con un'ansa di platino sterilizzata. Delle specie da me finora studiate, quelle che più si prestano per osservare questi fenomeni di coagulazione del latte e successiva dissoluzione del coagulo sono l'*Aspergillus varians* Wehm. e l'*Asp. flavus* Link; coltivando ad es. la prima specie su latte scremato, disposto in un sottile strato (alto 1 cm. circa) sul fondo di una Fernbach o di una grande Erlenmeyer di guisa che copiosa sia la aereazione, e mantenendo la coltura a circa 25° C., si ha uno sviluppo rigogliosissimo di mi-

(1) *Étude sur l'Aspergillose chez les animaux et chez l'homme.* Paris, 1897.

(2) Il latte da me adoperato (latte di una vacca tubercolotica tenuta in osservazione nel laboratorio) presentava, dopo essere stato sterilizzato all'autoclave, reazione anfotera.

celio che si mantiene bianco-candido per 4-5 giorni, nel qual tempo già ha avuto luogo la coagulazione del latte; dopo il micelio presenta una colorazione giallo-vivo, con qua e là delle *nuances* verdi (strato conidifero) e intanto il coagulo vien ridisciolto e dopo 8 giorni dalla semina non ce ne è quasi più traccia.

Altri liquidi adoperati per la coltura degli Ifomiceti, e che io non ho sperimentato, sono i seguenti: orina umana normale, sterilizzata e acida (Rénon, *loco cit.*, Boston (1), Pes (2), ecc.), mosto di birra (Rénon, Wehmer (3), ecc.), mosto di uva bianca (Rénon), siero di latte con acido tartarico, liquido di Nägeli, soluzioni di glicerina, maltosio (liquido di Sabourand) o glucosio con peptone 1 °/₀ e in genere tutti i liquidi ricchi in glucosio e un poco acidi.

Tra i *terreni solidi* esamineremo prima quelli che si possono render liquidi col riscaldamento e che portati a temperature più basse ritornano solidi, e poi quelli che restano sempre solidi. Tra i primi, importante per le osservazioni a cui può dar luogo, è la comune *gelatina* nutritiva usata in batteriologia; su questo terreno tutti gli Ifomiceti da me esaminati si sviluppano abbastanza bene; naturalmente se si tratta di specie che si sviluppa bene solo ad alte temperature, superiori a quelle alle quali la gelatina, anche se al 15-20 °/₀, si mantiene solida, si avrà a basse temperature uno sviluppo molto scarso e mancanza o quasi di sporificazione; questo è p. es. il caso dell'*Aspergillus fumigatus*.

Tutte le specie di Ifomiceti da me esaminate fluidificano la gelatina; la differenza sta nella rapidità di fusione e nel prodotto finale in cui la gelatina è trasformata. Si dice comunemente che i germi fondenti la gelatina producono un fermento proteolitico che peptonizza la gelatina; secondo le recenti ricerche di Mavrojannis (4) non tutti gli Schizomiceti fluidificanti sono capaci di condurre la trasformazione della gelatina fino al grado di peptoni (o anche più in là), ma alcuni limitano la loro azione alla trasformazione della gelatina in gelatosi; un mezzo facile e spedito per constatare se la gelatina è stata trasformata in gelatosi o in peptoni sarebbe, secondo il citato autore, l'aggiunta di poche goccie di una soluzione di formaldeide alla gelatina fluidificata, oppure meglio ancora l'esposizione di questa ai vapori di formaldeide; se dopo un certo numero di giorni (da 3 a 15, per gli Schizomiceti esaminati dal Mavrojannis) la gelatina torna a solidificarsi, segno è che essa, dai fermenti del germe esaminato, era stata trasformata in gelatosi; se invece anche dopo molti giorni e perfino dopo qualche mese

---

(1) Proc. of the path. soc. of Philadelphia, I, 4.

(2) Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1904, n. 15. Quest'ultimo autore ha accuratamente studiato lo sviluppo di alcune specie del genere *Penicillium* ed *Aspergillus*, e inoltre di alcune mucorinee, ecc., sia nell'urina umana acida normale e sterilizzata, sia in questa urina neutralizzata, sia nell'urina che già aveva subito un processo di fermentazione alcalina, sia nell'agar o nella gelatina a base di urina, e conclude che tutti questi terreni a base di urina non costituiscono un mezzo di elezione per la coltura artificiale degli Ifomiceti.

(3) *Die Pilzgattung* Aspergillus, ecc. Mémoires de la Société de phys. et d'hist. natur. de Genève, 1901.

(4) Zeitschrift f. Hygiene, 1903, Bd. 45.

la solidificazione non ha luogo, segno è che la gelatina era stata trasformata in peptoni e forse anche più oltre; il Mavrojannis avrebbe così trovato che la gelatina è trasformata in gelatosi dagli stafilococchi piogenei aureo ed albo, dal bacillo del carbonchio e dal piocianeo, dal vibrione del colera; in tutti questi casi la gelatina risolidificata dal formolo torna di nuovo a fondere per l'azione del calore, il contrario di quello che accade per la gelatina (gelatina nutritiva al 10 °/₀, a reazione neutra) sottoposta ai vapori di acqua bollente nella pentola di Koch e che portata a basse temperature non torna a solidificarsi; tale gelatina così trasformata, sottoposta all'azione della formaldeide, si solidifica (1), ma non è più fluidificata dal calore. Ho voluto ripetere queste interessanti esperienze del Mavrojannis con tutti gli Ifomiceti che avevo a mia disposizione ed ho potuto constatare che quasi tutte le specie da me esaminate trasformano la gelatina in un prodotto che non è solidificabile per l'azione della formaldeide, neppure quando questa azione si prolunga per molti giorni; tale è il caso del *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. varians*. *Oospora verticillioides*, ecc. Invece l'*Aspergillus fumigatus* Fres. trasforma la gelatina in un prodotto (gelatosi?) coagulabile dal formolo.

Ecco come ho proceduto in questi esperimenti: la gelatina da me adoperata era la comune gelatina nutritiva al 15 °/₀, a reazione leggerissimamente alcalina; la semina (un'ansa di spore) e la coltura delle singole specie aveva luogo nelle comuni provette; per le specie aventi l'*optimum* di temperatura a 25°-37° C. (*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) mantenni i tubi di coltura in un termostato alla temperatura di circa 37°; per le altre specie aventi l'*optimum* di sviluppo a temperature più basse, feci due serie di colture, che tenni una a 20°-22° circa, l'altra a 37°; nel termostato a 37° misi pure una coltura di tifo, cioè di un germe certamente non fluidificante la gelatina, e una provetta di gelatina mantenuta sterile: ambedue queste provette dovevano servire di controllo per assicurare che la fusione della gelatina nei tubi di coltura tenuti a 37° avvenisse realmente per opera degli enzimi prodotti dalla specie in esame; a tale uopo, a cominciare dal terzo giorno dopo la semina, immergevo ogni giorno tutti i tubi tenuti a 37° nell'acqua ghiaccia, lasciandoveli per qualche minuto; i primi giorni in tutte le provette la gelatina si solidificava, ma poi, a cominciare dal sesto o settimo giorno, nei tubi di coltura dell'*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, ecc., la solidificazione della gelatina portata nell'acqua fredda non aveva più luogo, segno che già era avvenuta la trasformazione della gelatina per azione dei fermenti proteolitici prodotti dalla muffa, giacchè nelle due provette di controllo (gelatina sterile e coltura di tifo) la gelatina tornava sempre a solidificarsi e ciò anche dopo molti giorni di permanenza nella stufa (2).

Con l'osservazione giornaliera dei tubi di coltura venivo a conoscere il

---

(1) Se però l'esposizione al vapore acqueo si prolunga al di là di un'ora, la gelatina non diventa più solida neppure per azione del formolo.

(2) Sul rigore di questo metodo, introdotto nella tecnica batteriologica da Bitter (Archiv f. Hygiene, vol. V, 1886) e che si presta per la dimostrazione della fluidificazione della gelatina da parte di germi che non si sviluppano alla temperatura di 20°-22° (p. es., della morva), vedi il trattato di batteriologia del Gunther. Servendomi di questo metodo, ho potuto dimostrare che alcuni Ifomiceti, ad es. l'*Aspergillus fumigatus* e l'*A. niger*, dei quali il Wehmer dice che non fondono affatto o quasi la gelatina, la flui-

giorno in cui si era iniziata la fluidicazione della gelatina; a partire da questo giorno lasciavo trascorrere ancora parecchi altri giorni per lasciare agli enzimi prodotti dall'Ifomiceta tutto il tempo di esplicare completamente la loro azione; trascorso questo tempo travasavo un po' della gelatina fluidificata in una capsula di vetro sterilizzata; decantando con cura, riuscivo quasi sempre ad avere del liquido perfettamente limpido e solo in qualche rarissimo caso ricorsi alla filtrazione (traverso filtri sterilizzati), cosa del resto superflua dato lo scopo delle mie ricerche. Le capsule contenenti la gelatina fluidificata venivano collocate sotto una grande campana di vetro, sotto la quale già si trovava una larga capsula piena di formalina (formaldeide al 40 %); le capsulette con la gelatina venivano a trovarsi sopra al vaso di formalina, sostenute da un apposito treppiede; la gelatina era quindi bene esposta all'azione dei vapori di formaldeide; tutto l'apparecchio era conservato nella stanza refrigerante alla temperatura di circa 15° C. In nessuna delle capsule potei mai constatare la solidificazione della gelatina, meno in quelle contenenti la gelatina fluidificata dall'*Aspergillus fumigatus*; in queste il fenomeno si ripetè costantemente, anche se la coltura era stata lasciata nel termostato per molti giorni. In base a tale fatto avrei dovuto concludere che l'*Asp. fumigatus* trasforma la gelatina in gelatosi; se non che, contrariamente ai risultati ottenuti dal Mavrojannis per le specie di Schizomiceti su citate, esponendo la gelatina risolidificata dai vapori di formolo a una temperatura di 37° C. e anche più, la gelatina non si scioglieva; l'azione proteolitica dell'enzima prodotto dall'*Asp. fumigatus* sarebbe dunque simile a quella del vapore acqueo a 100° C., lasciato agire per meno di un'ora? Non ho potuto per ora approfondire questa quistione, sulla quale mi riservo di tornare in seguito (1).

Oltre la comune gelatina nutritiva possono adoperarsi con vantaggio per la coltura degli Ifomiceti altri substrati nutritivi a base di gelatina, ad es. la gelatina al mosto di birra di cui ho già fatto cenno, la gelatina glucosata ed acida (2), ecc. Si possono fare delle colture seminando le spore nella

---

difichino invece rapidamente; tutto sta a metterle in condizioni tali che siano favorevoli al loro rigoglioso sviluppo e alla produzione abbondante dell'enzima proteolitico; prima tra queste condizioni è la temperatura, e i risultati negativi del WEHMER si spiegano così benissimo se si pensa che egli coltivava i suddetti Aspergilli a 18° circa. Bisogna anche notare che la gelatina da lui adoperata non era la comune gelatina nutritiva, ma la cosiddetta *Bierwürzegelatine*, cioè la gelatina al mosto di birra; io però credo che la differenza dei risultati. più che alla diversa composizione del terreno nutritivo, debba ascriversi alla diversa temperatura, tanto più che la *Bierwürzegelatine* adoperata dal WEHMER conteneva solo il 5 % di gelatina e doveva quindi essere più facilmente e più rapidamente fluidificabile, e inoltre per la sua composizione rappresentava un substrato nutritivo più favorevole allo sviluppo degli Ifomiceti in genere (vedi nota 2ª, pag. 67).

(1) Ricorderò solo qui che l'HAUSER (Münchener med. Wochenschrift, 1903) dice che la gelatina fluidificata dalle specie batteriche liquefacienti sarebbe sempre risolidificata dai vapori di formalina e che la gelatina così solidificata non tornerebbe a fondere per azione del calore.

(2) Tutte le varietà di *Penicillium glaucum* esaminate da DI PIETRO (*Studio morfologico e biologico sul* Penicillium glaucum (*varietà tossica*), Teramo, 1904) fondono la gelatina, alcune però rapidamente, altre lentamente; tra queste ultime si troverebbe la varietà da lui denominata *tossica*, il cui potere fluidificante aumenta quando è coltivata in gelatina glucosata e meglio ancora in gelatina glucosata e acida (vedi nota 2ª, pag. 66).

gelatina fusa col calore e poi si possono anche fare delle colture a piatto, lasciando solidificare la gelatina; ma più caratteristiche sono le comuni colture per infissione; in queste si ha generalmente uno sviluppo abbondante, più o meno rigoglioso, alla superficie, in forma di un feltro miceliare bianco che poi presenta quasi sempre la caratteristica colorazione dello strato conidifero, il quale però per lo più non è molto sviluppato e talora manca del tutto o quasi; lungo il tratto di infissione irradiano nello spessore della gelatina numerose barbe orizzontali, finissime, biancastre, più o meno lunghe, che più tardi col fluidificare della gelatina si disfanno; la fusione della gelatina avviene più o meno rapidamente a seconda della specie e delle condizioni di sviluppo; essa si inizia immediatamente sotto al feltro superficiale e prosegue verso il basso e spesso è preceduta da un intorbidamento della gelatina stessa, dovuto alla formazione ed accumulo di minutissimi granuli che danno alla gelatina un aspetto polverulento e esaminati al microscopio appaiono come tanti cristallini di forma diversa, tra i quali se ne distinguono alcuni più grandi, ottaedrici, presentanti la caratteristica forma a busta da lettere propria dei cristalli di ossalato di calcio; è noto che tra gli acidi organici si trova quasi sempre in notevole quantità nel micelio degli Ifomiceti l'acido ossalico; questo strato polverulento si inizia generalmente sotto al feltro superficiale e cresce di spessore, ma poi mano a mano che procede la fusione della gelatina, esso si porta sempre più in basso, per scomparire a fluidificazione completa della gelatina, la quale resta limpida e per lo più incolore, con un deposito polverulento al fondo della provetta. Qualche volta, ad es. nell'*Aspergillus niger*, la fusione della gelatina è accompagnata dalla diffusione in seno alla gelatina fusa di un pigmento, che nel caso dell'*A. niger* va da un giallo-oro pallido fino a a un caffè chiaro. Quasi sempre nella gelatina fusa resta sospeso ed ondeggiante un fittone cilindro-conico avente la sua base applicata alla faccia inferiore del feltro superficiale e l'apice al piano di separazione tra lo strato di gelatina fusa e quello di gelatina solida; esso è dunque tanto più allungato quanto più avanzata è la fluidificazione della gelatina, in seno alla quale lo si vede ondeggiare quando si rota la provetta attorno al proprio asse; questo fittone che spesso persiste anche a fusione completa della gelatina è costituito dal micelio sviluppatosi lungo la linea di infissione.

Altri terreni nutritivi solidi che si possono rendere liquidi col riscaldamento sono quelli a base di *agar;* cito tra questi il comune agar nutritivo usato in batteriologia, sul quale però non tutti gli Ifomiceti si sviluppano bene; per esempio, l'*Aspergillus fumigatus* e l'*A. flavus*, nelle colture a striscio su agar a becco di flauto, danno una leggera patina miceliare biancastra che solo di rado e con ritardo presenta una debole colorazione, brunastra nel primo caso, giallo-verdastra nel secondo; scarso è dunque lo sviluppo e scarsissima la sporificazione. Più favorevole allo sviluppo degli Ifomiceti in genere è l'agar glucosato, specialmente se acido; non è necessario nella preparazione di tale agar aggiungere un acido; basta lasciare all'agar la sua acidità naturale; sarà bene, invece, aumentare il quantitativo del glucosio, portandolo dal 0. 3–0. 5 per cento (comune agar glucosato) fino al 3-5 per cento. Un terreno culturale ottimo per gli Ifomiceti è rappresentato dall'*agar al Raulin*, cioè da agar preparato con liquido di Raulin; ho trovato accennato questo substrato nutritivo solo nel libro già citato del

RÉNON, il quale però nulla dice sul modo di prepararlo; nè darò perciò un cenno io stesso. Dapprima io preparavo l'agar al Raulin mischiando a parti uguali il comune agar nutritivo e il liquido di Raulin; la sterilizzazione però (alla pentola di Koch o all'autoclave) non va fatta dopo la miscela, perchè altrimenti l'agar non si solidifica più col raffreddamento; bisogna quindi preparare e sterilizzare separatamente i due terreni, poi mischiarli alla temperatura di circa 50°-60°, agitar bene e distribuire con precauzione la miscela in provette sterilizzate, che poi si lasciano in osservazione per vari giorni alla temperatura di 25°, per assicurarsi che tutte le provette siano sterili: naturalmente, se si vuole che la miscela contenga 1. 5 per cento di agar, l'agar nutritivo dovrà contenerne il 3 per cento. In seguito, al comune agar nutritivo con agar al 3 per cento, ho sostituito una semplice soluzione in acqua di agar al 3 per cento, che mischiavo a parti uguali (dopo sterilizzazione separata) con liquido di Raulin; il terreno che si ottiene con questo procedimento è anch'esso perfettamente solido e trasparente, ed essendo inoltre incolore o biancastro, è più adatto per la constatazione dei pigmenti prodotti dagli ifomiceti; come il liquido di Raulin, esso costituisce un ottimo terreno elettivo per la coltura artificiale degli Ifomiceti. Un altro terreno a base di agar, segnalato dal RÉNON come uno dei più favorevoli per lo sviluppo dell'*Aspergillus fumigatus* e che io non ho sperimentato, è l'agar al mosto di birra; cito ancora: l'agar al mosto d'uva bianca, l'agar mischiato col liquido di Sabourand, ecc., (Rénon, *loco cit.*). Come per gli Schizomiceti, le colture in agar degli Ifomiceti si possono fare per infissione, per strisciamento, o a piatto (in capsule Petri); quanto ai vari caratteri che si possono osservare, sopratutto nelle colonie e nelle colture a striscio, rimando alla descrizione fin troppo particolareggiata e minuziosa data da DI PIETRO (*loco cit.*) a proposito del *Penicilium glaucum.*

Tra i *terreni nutritivi solidi non fluidificabili col riscaldamento*, ho trovato ottimi, per la coltura degli Ifomiceti in genere, la patata e la polenta. Le *patate* si possono preparare secondo il metodo originario di Koch, o secondo quello di Esmarch o secondo quello di Roux; il più comodo è questo ultimo; lo sviluppo è rigoglioso, specialmente se si umettano le patate con liquido di Raulin. Di tutti i substrati culturali che ho adoperato, la patata bagnata con liquido di Raulin è quella che conservà più a lungo inalterato il colore originario dello strato conidifero, colore che generalmente nelle altre culture diventa con maggiore o minore rapidità più fosco. Le colture su decotto sterilizzato di farina di granturco (*polenta*) si possono fare nelle comuni provette o nelle capsule Petri; è meglio adoperare una polenta pochissimo consistente, perchè più è umido il terreno e più rigoglioso è lo sviluppo; io mischio la farina con l'acqua in proporzioni tali che un cucchiaio della pappa così ottenuta posta sul fondo di una capsula Petri vi si distenda a poco a poco in un sottile strato di spessore uniforme, ricoprente tutto il fondo; la sterilizzazione deve essere molto accurata (nell'autoclave per un'ora e più, oppure nella pentola di Koch, tre giorni di seguito, per 20-30 minuti al giorno). Se non si vuole una patina miceliare abbondante, ma semplicemente fare una coltura, invece di capsule Petri converrà adoprare delle provette al cui fondo si versa la suddetta pappa fino all'altezza di 2-3 cm.; si possono anche fare delle colture a tubo inclinato; in tal caso la pappa sarà un po' più consistente e le provette si terranno inclinate fino a

sviluppo completo dell'Ifomiceta. Se si vuole un terreno incolore, il decotto si farà con farina di mais bianco o anche di frumento, oppure si userà un pezzo di mollica di pane bagnato in acqua o in liquido di Raulin e sterilizzato. Spesso nelle colture su polenta si ha una colorazione miceliare caratteristica e produzione di un odore pure caratteristico, che mancano o sono appena accennati nelle colture sugli altri substrati nutritivi; tale è, per esempio, il caso della *Oospora verticillioides* Sacc., le cui colture su terreni maidici presentano una colorazione rosea intensa e tramandano un forte odore di etere acetico; anche il caratteristico odore del *Penicillium glaucum* è più forte nelle colture su mais.

Condizioni di sviluppo.

Esse si riducono, oltre che ad una appropriata composizione e reazione del substrato nutritivo, alla temperatura, umidità e aereazione. Poco ho da aggiungere a quello che già si conosce in proposito e di cui ho già fatto qualche cenno. L'*optimum*, il *maximum* e il *minimum* di temperatura variano sensibilmente per le differenti specie. Quanto all'umidità, benchè la percentuale d'acqua strettamente necessaria allo sviluppo degli Ifomiceti in genere sia bassissima (10 °/₀ circa), altissima è invece la percentuale optimum (80 °/₀ circa). Quanto all'ossigeno, già ho detto come generalmente esso sia indispensabile allo sviluppo e più ancora alla sporificazione degli Ifomiceti; per lo sviluppo del micelio però ne bastano piccolissime tracce; tutti gli Ifomiceti da me studiati si sviluppano in seno e in fondo ai liquidi di coltura (brodo, liquido di Raulin, ecc.) e anche dentro la gelatina e l'agar (sviluppo di colonie da spore seminate in gelatina e agar liquefatti e rimaste imprigionate dentro a questi terreni solidificati col raffreddamento), ma lo sviluppo è per quasi tutti scarso; si formano cioè delle piccole colonie che restano persistentemente biancastre, segno questo che la sporificazione non ha luogo. Un'eccezione a questa regola l'ho trovata per le specie del genere *Oospora*, che sporificano abbondantemente anche in fondo ai liquidi culturali; per queste osservazioni e per i tentativi di coltivare tali specie anaerobicamente, rimando all'altro mio lavoro già citato.

Conservazione delle colture.

Essendo le spore degli Ifomiceti in generale molto resistenti, le colture si conservano vive per mesi ed anni, solo è necessario impedire l'evaporazione e l'essiccamento del substrato, il che si ottiene coprendo la provetta con un cappuccetto di gomma o meglio saldandone l'estremità aperta alla fiamma. In tali condizioni tutte le specie di Ifomiceti da me studiate si sono conservate per almeno quasi due anni in vita; quale sia per ciascuna specie il limite massimo di resistenza delle spore non potrò constatarlo che di qui a qualche anno. Per ora posso dire che le spore della *Oospora verticillioides* Sacc., che pure mi sembrano essere meno resistenti di quelle delle specie di Penicilli e Aspergilli da me studiate, resistono per cinque anni almeno; io infatti ho ottenuto la suddetta specie in coltura pura da un piccolo frammento di canna conservato da cinque anni nella collezione micetologica del dott. Saccardo e la cui superfice era invasa da questo Ifomiceta.

Colture a scopo diagnostico e biologico.

La determinazione del genere e talora anche della specie cui appartiene un campione di muffa che si debba esaminare, si può fare con la osservazione microscopica diretta. Basta prelevare una piccolissima quantità del materiale in esame, distenderla e, se occorre, dilacerarla con gli aghi in una goccia di acqua o di glicerina diluitissima posta su un comune vetrino porta-oggetti, coprire col vetrino copri-oggetti ed esaminare al microscopio, prima con un debole ingrandimento per vedere la forma generale del micelio, la disposizione e ramificazione delle ife fertili, la forma di sporificazione, ecc., poi con un ingrandimento più forte e con l'oculare micrometrico per vedere la forma delle spore e misurare lo spessore delle ife sterili e fertili, le dimensioni delle spore, ecc. ecc. Ma con la semplice osservazione diretta non sempre riesce, neppure a chi ha una grandissima pratica, di determinare la specie. È necessario allora isolare e coltivare in coltura pura la specie in esame. Quanto all'*isolamento* degli Ifomiceti, descriverò anzitutto un metodo semplicissimo ideato da Gosio per isolare le muffe dalle cariossidi di granturco guasto e che naturalmente si può applicare in molti altri casi: sul fondo di una capsula Petri si colloca un foglio di carta bibula che lo ricopra esattamente e nella capsula così preparata e sterilizzata si versa un po' di liquido di Raulin sterile, in quantità tale che la carta ne resti bene bagnata e tutta ricoperta da un sottile velo liquido; sulla carta si dissemina poi il materiale in esame, ad es. la farina della cariosside previamente spaccata per metà con un bisturi sterile, e si lascia la capsula a sè alla temperatura di 25° C. circa, alla quale tutti o quasi gli Ifomiceti si sviluppano abbastanza bene. Generalmente dopo 3-4 giorni si osservano sulla carta delle colonie più o meno numerose a seconda della ricchezza in spore del materiale seminato; qualche volta prelevando un'ansa di micelio dalle singole colonie sporificate e facendone dei trasporti in tubi di coltura, si riescono ad avere senz'altro delle colture pure di Ifomiceti; altre volte invece è necessario ripetere l'isolamento in altre capsule Petri ugualmente preparate, nelle quali si semina del materiale preso dalla prima capsula; le diverse specie si distinguono alla diversa forma e sopratutto alla diversa colorazione delle colonie, dopo avvenuta la sporificazione; ci sono però molte specie di Ifomiceti le cui colonie sporificate presentano lo stesso colore, talvolta con una tonalità di tinta perfettamente identica; è questo il caso p. es., tra gli Ifomiceti che più comunemente si isolano dal granturco guasto, da una parte del *Penicillium glaucum* e dell'*Aspergillus fumigatus* e dall'altra dell'*Aspergillus flavus* e *A. varians*. Quanto alle due prime specie, le cui colonie a sporificazione avanzata presentano un colorito verde-celeste o glauco, se ne può subito constatare la mescolanza esaminando una colonia sul fondo della capsula Petri a piccolo ingrandimento (microscopio Koristka: oculare 3, obiettivo 3 o anche 5); dalla terminazione delle ife fertili a ramificazione penicillare o a capolino aspergillare facilmente distinguibile alla periferia della colonia, si vede subito se si ha a che fare con un Penicillo o con un Aspergillo o con tutte e due le forme; in quest'ultimo caso se realmente si tratta della mescolanza del *Pen. glaucum* con l'*Asp. fumigatus*, si può per separarli profittare del diverso *optimum* e *maximum* di tempera-

tura favorevole allo sviluppo delle due specie; l'*optimum* di temperatura dell'*Asp. fumigatus* è a 37° C. circa, alla qual temperatura il *Pen. glaucum* o non si sviluppa affatto o per lo meno non sporifica; prelevando un'ansa di micelio con spore dalla colonia in esame e trasportandola in una delle solite capsule Petri, e coltivando a 37° C. o anche a 40°, si avranno delle colonie isolate di *Asp. fumigatus*. Questo metodo non riesce altrettanto facilmente con l'*Aspergillus varians* e l'*Asp. flavus*; l'*optimum* di temperatura di quest'ultimo è pure a 37° C., ma a questa temperatura sporifica anche l'*Asp. varians* quantunque abbia il suo *optimum* a circa 25° C.; le colonie sporificate di queste due specie presentano una colorazione giallo-verde o verde-giallastra a seconda dell'età; per constatare la loro associazione in una stessa colonia, non basta l'esame di questa a piccolo ingrandimento; bisogna fare un preparato microscopico, nel quale la diversa grandezza delle spore (fino a 6-7 μ di diametro per l'*Asp. flavus*, 3 o poco più per l'*Asp. varians*) offre un criterio facile e spedito per la diagnosi. Per isolare l'una dall'altra queste due forme si può ricorrere allora al classico metodo delle piastre di Koch, adoperando come substrato nutritivo l'agar al Raulin preparato in uno dei due modi detti sopra; oppure si potranno preparare tre capsule Petri con carta bibula bagnata nel liquido di Raulin e in esse fare secondo lo stesso metodo di Koch le successive diluizioni del materiale prelevato dall'associazione miceliare. Alcune volte infine l'isolamento di una determinata specie di muffa riesce bene con un artificio semplicissimo che ricorda quello impiegato nella tecnica batteriologica per la cosiddetta pesca delle colonie; esso è facilmente applicabile agli Aspergilli, a quelli specialmente il cui capolino conidioforo è sorretto da una lunga ifa fertile, è bene sviluppato e nettamente caratterizzato dal colore delle spore; tale è il caso, p. es., dell'*Aspergillus niger*; anche ad occhio nudo e meglio ancora con una lente oppure sotto al microscopio a debole ingrandimento, si può in una colonia toccare con la punta di un sottilissimo filo di platino sterilizzato uno dei capolini neri distinguibili anche ad occhio nudo e che, specialmente ai margini della colonia, sono ben separati gli uni dagli altri; si è così sicuri di prelevare spore tutte della stessa specie e con un po' di pratica questo metodo riesce facilmente e bene non solo nelle colonie sviluppatesi in una capsula Petri, ma anche in quelle sviluppatesi in una coltura in goccia pendente, di cui dirò tra poco.

Una volta che con un metodo o con l'altro si è riusciti ad isolare una data specie di Ifomiceta, si possono studiarne tutti i caratteri culturali adoperando come substrati nutritivi alcuni di quelli sopra enunciati; si osserverà la rapidità di sviluppo e di sporificazione, l'*optimum*, il *maximum* e il *minimum* di temperatura, la colorazione del micelio e quella dello strato conidifero all'inizio e al termine della sporificazione e nelle colture invecchiate, la forma delle colonie, la rapidità di fluidificazione della gelatina e l'azione dei vapori di formaldeide sulla gelatina fusa, la coagulazione del latte, l'odore delle colture, ecc. Contemporaneamente facendo dei preparati microscopici con materiale preso da colture pure, si osserveranno tutti i caratteri morfologici (dimensioni delle ife sterili e fertili, degli sterigmi, dei conidi, ecc.; forma di sporificazione, ramificazione delle ife fertili, ecc.; forma degli sterigmi; forma e aspetto dei conidi e loro reciproca disposizione, ecc.). Un metodo semplicissimo di coltura e preparazione degli Ifomiceti a scopo

diagnostico è stato ideato da Gosio (1): in grosse provette sterilizzate contenenti al fondo 2-3 cmc. di liquido nutritivo e un vetrino coprioggetti emergente dal liquido per due terzi circa della sua superficie, si semina un po' di materiale cercando di ben distribuirlo nel liquido stesso, possibilmente da una sola parte del vetrino; coltivando a temperatura utile, presto la superficie del liquido si copre di una pellicola miceliare che a poco a poco si avanza sul vetrino, ordinariamente spessissima in corrispondenza del pelo liquido e via via assottigliata in alto; avvenuta la sporificazione, si estrae con un'ansa di platino il vetrino, lo si deterge dalle parti grossolane o superflue della patina miceliare, lasciando solo su una faccia le estreme e diradate espansioni del micelio, poi si procede al trattamento del preparato colle norme note nella tecnica batteriologica. Avendo adoperato questo metodo per le varie specie di Ifomiceti da me studiate, ho trovato che spesso, ad es. per le specie del genere *Penicillium* e *Aspergillus*, esso è utile e comodo perchè mentre da una parte permette di studiare i caratteri culturali, dall'altra offre il modo di fare una bella e interessante preparazione microscopica. Esso però non offre nessun vantaggio per le specie del genere *Oospora* e in generale di tutte quelle specie le cui spore, pur essendo collegate in catena all'apice dell'ifa fertile, si distaccano facilmente al più piccolo urto (2). In questi casi è indispensabile ricorrere alle *colture in goccia pendente;* questo metodo che richiede un po' di pazienza è però il più istruttivo di tutti, perchè, oltre al permettere lo studio esatto e preciso dei caratteri morfologici e in parte anche dei caratteri culturali, offre su tutti gli altri il vantaggio di studiare il ciclo biologico degli Ifomiceti, giacchè in una coltura in goccia pendente si possono seguire passo passo tutte le fasi di sviluppo di un Ifomiceta, dalla germinazione di una spora alla produzione del micelio, allo sviluppo delle ife fertili e alla formazione degli sterigmi e delle spore; l'osservazione di tutte queste diverse fasi di sviluppo è accuratamente descritta dal Rénon (3) per l'*Aspergillus fumigatus* e ad essa io rimando il lettore. Quanto alla tecnica delle colture in goccia pendente essa è la stessa seguita in batteriologia; i substrati nutritivi da adoperare sono quelli trasparenti, liquidi o solidi, sopra enumerati: brodo, liquido di Raulin, gelatina, agar, ecc. Un particolare a cui va data molta importanza è quello di fare in modo che nella goccia culturale ci siano solo pochissime spore; l'ideale anzi sarebbe che in ogni goccia ci fosse una sola spora; ciò non solo per essere più sicuri della purezza della cultura e per poter seguire con chiarezza tutte le successive fasi di sviluppo di una spora, ma anche perchè se le spore sono molte, il materiale alimentare contenuto nella goccia è presto esaurito dal rigoglioso micelio che si sviluppa e allora la sporificazione si compie in maniera affrettata, tumultuosa e irregolare, come se l'Ifomiceta, venendogli a mancare il nutrimento, avesse fretta di produrre le forme di resistenza che sono le spore. Per riuscire ad avere una sola o poche spore in una goccia culturale seguivo dapprima questo metodo: al centro di un vetrino copri-oggetti sterilizzato deponevo con una piccola ansa di platino quattro piccole gocce

(1) *Su un nuovo metodo di preparazione degli ifomiceti.* Roma, 1898.
(2) Per osservazioni più particolareggiate, rimando all'altro mio lavoro già citato.
(3) *Loco cit.*, pag. 47 e seguenti.

distaccate di liquido nutritivo; poi con una punta di platino portavo in una goccia un po' di spore, le emulsionavo e con la stessa punta di platino infettavo successivamente le altre tre gocce; nella terza o almeno nella quarta goccia riuscivo così ad avere pochissime spore; però con questo metodo, oltre al pericolo di inquinamento delle gocce per la caduta di qualche spora dall'aria durante l'operazione piuttosto lunga, succedeva l'inconveniente che mentre nella 1ª e 2ª goccia cariche di spore si aveva un rapido sviluppo e una rapida sporificazione, nella 3ª e 4ª goccia, in cui lo sviluppo era più lento, difficilmente si aveva sporificazione o questa era appena tentata; questo fatto, constatato da me più volte, credo debba attribuirsi alla mancanza di ossigeno, consumato dall'Ifomiceta sviluppatosi abbondantemente nelle prime gocce. Ricorsi allora all'altro metodo più sicuro, ma che implica un maggior consumo di materiale nutritivo, cioè alla emulsione di una piccolissima ansa di spore in un tubo di brodo, di liquido di Raulin, ecc., di gelatina o agar fluidificati, ecc., e all'allestimento di tre o quattro colture in goccia pendente, prelevate con un'ansa di platino, da questa emulsione così preparata. Un altro particolare a cui bisogna por mente è quello di eseguire la coltura a una temperatura più bassa dell'*optimum* di sviluppo per la specie in esame, perchè altrimenti lo sviluppo è troppo rapido e allora accade spesso che la sporificazione sia affrettata.

Quanto alla diversità di sviluppo nello spessore della goccia culturale e alla superfice di essa cioè all'aria libera, ho già detto diffusamente nell'altro mio lavoro; qui ricorderò soltanto che per le specie del genere *Penicillium* e *Aspergillus* la formazione dei penicilli e capolini conidiferi ha luogo soltanto alla superfice della goccia; invece per le specie del genere *Oospora* la produzione dei conidi è rigogliosa anche dentro la goccia; ma la loro caratteristica disposizione in catena all'apice delle ife fertili si osserva solo nell'aria, mentre dentro la goccia, maggiore essendo la resistenza del mezzo, le spore prodotte all'apice di un' ifa si distaccano l'una dall'altra mano a mano che si formano e per lo più restano accumulate lì vicino, dando spesso luogo a svariate figure artificiali; le spore e le ife sviluppatesi nell'aria si riconoscono ai loro contorni più oscuri.

Istituto d'Igiene della R. Università di Sassari

Studio sul Favismo

del Prof. CLAUDIO FERMI

Coadiuvato dallo studente P. MARTINETTI

PROSPETTO DEL LAVORO.

I.

Introduzione.

Sotto il nome di favismo intendesi una speciale malattia prodotta dall'inalazione del profumo dei fiori delle piante di fave o dall'ingestione dei frutti verdi in individui dotati di una particolare predisposizione.

La denominazione di favismo non è usata ovunque, nè da tutti quelli che scrissero su questa entità morbosa. Usando il termine siciliano, altri la chiamarono Zafra (1), ed in Sardegna non ha nome speciale, ma viene ricordata secondo che i fiori o i frutti delle fave producono il loro effetto; così in provincia di Sassari si denomina l'individuo colpito da favismo « affabaddu » ed in provincia di Cagliari lo si chiama « striau ».

(1) Zafra in arabo significa giallo.

Il favismo è una malattia non ancora descritta nei trattati e della quale ben poche notizie si hanno dalle scarse pubblicazioni uscite sulla medesima.

Mentre infatti sono scarsissimi i casi clinici pubblicati sul favismo, quasi nulla sappiamo di sicuro sulla etiologia, sulla diffusione, sulla morbidità, sulla mortalità di questa affezione.

Nulla inoltre di preciso conosciamo sul periodo d'incubazione; ignoriamo quasi tutto ciò che riguarda l'immunità e la predisposizione, cioè l'influenza dell'ereditarietà, del sesso, dell'età, delle condizioni sociali, delle professioni, delle malattie pregresse e ben poco sappiamo sulla terapia.

Data questa condizione di cose nella quale ci trovavamo rispetto alla singolare quanto interessante affezione in discorso, mi parve utile farne oggetto di particolare studio.

II.

Storia.

Le varie pubblicazioni uscite su quest'argomento contengono dei casi clinici e qualche ipotesi sull'etiologia di questa malattia. Così dopo la pubblicazione del dott. Messina di Catania, il quale pel primo nel 1851 (1) scrisse sopra un' intossicazione da fave, vennero in ordine cronologico: Minà La Grega (2); Enrico Di Pietra (3); Mulè Bertòlo (4); Rizzo Maltera (5); Morici (6); Piga (7); D. Vercelli (8); Montano (9); De Semo (10); Pietro Pucci (11); Grande (12); Bernabei (13); Giotti (14); De Camillis (15); R. Stevani (16). Que-

(1) Antecedentemente al medesimo, non riuscii a trovare cenno alcuno di questa malattia. Le numerose opere antiche di medicina consultate in proposito figurano alla fine del lavoro.
(2) Palermo 1856.
(3) Catania 1858.
(4) Messaggero di Caltanissetta, n. 78-79, anno 1873. La pratica del Medico, Napoli, giugno 1901, n. 11.
(5) Osservatore di Palermo, vol. VIII, fasc. IV, pag. 302.
(6) Osservatore di Palermo, vol. IX, fasc. V-VI.
(7) Il Farina, giornale medico, Sassari.
(8) Gazzetta degli ospedali, 1902.
(9) IX Congresso Medico Internazionale di Roma, 24 aprile 1904.
(10) IX Congresso Medico Internazionale di Roma 1894.
(11) Gazzetta degli ospedali, anno 1896, pag. 421 al n. 40.
(12) Gazzetta degli ospedali, 1898, n. 67, pag. 720.
(13) Atti del congresso di Siena, luglio 1898, n. 88.
(14) Gazzetta degli ospedali, anno 1899, n. 4, pag. 45.
(15) Rivista medica, agosto 1901.
(16) Arch. italiano di Otologia, vol. XVI, fasc. I, 1904.

sta è l'ultima pubblicazione uscita sull'argomento. L'autore prese le mosse, come egli dichiara, da uno studio da me da lungo tempo iniziato su questa malattia. « Si fu appunto — scrive l'autore — dietro una circolare che il chiarissimo prof. Fermi mandò a tutti i medici della Sardegna che io, allora medico condotto, cominciai a volgere la mia attenzione su questi interessanti casi ».

Ma per dimostrare in modo indiscutibile l'esistenza di questa singolare malattia, come entità morbosa ben definita, prodotta dall'azione delle fave, come anche per farla conoscere dai Clinici, dagli Igienisti, ecc., ed entrare nei Manuali, non potevano bastare certo e non sono bastate, le pubblicazioni di qualche caso clinico e di qualche vaga ipotesi.

III.

Casistica del favismo (1).

Allo scopo sia di togliere qualunque dubbio sull'esistenza di questa entità morbosa, come anche di poterne intraprendere lo studio, ho creduto indispensabile raccogliere e studiare un buon numero di casi clinici (circa una sessantina), dei quali, per altro, presenterò per brevità soltanto alcuni.

Avverto, però, che, date le non lievi difficoltà che s'incontrano, ho dovuto limitarmi spesso ad una storia sommaria ed al quadro sintomatologico più saliente.

Colmerò nella prossima primavera questa lacuna studiando un maggior numero di ammalati più completamente.

I. — O... C... d'anni 8, V... B... di anni 8, P... P... d'anni 9 e F... P... di anni 11, sono colpiti di favismo nel maggio dopo aver mangiato fave fresche. Il primo la mattina seguente ha vomito intenso ed ingiallisce per tutto il corpo. Le sclerotiche sono di un giallo carico; contemporaneamente ha cardiopalmo, 130-140 battiti al minuto. L'*ictus cordis*, grandemente rinforzato, si vede diffuso a tutta l'aia cardiaca. I toni sono chiari e forti specialmente alla punta, dove il primo assume carattere soffiante nella 5ª giornata. Il polso frequente e pieno, frequente e superficiale il respiro, interrotto da qualche inspirazione profonda. Manca la febbre. Il vomito si ripete per 4 giorni, vengono emesse bucce di fave inalterate, e ha odore acido, bilioso.

---

(1) Ringrazio sentitamente tutti quei colleghi che mi furono larghi di aiuti nel presente lavoro.

Le urine prima verdastre diventano dopo 36 ore nerastre e depositano un sedimento granuloso bruno. Si ha in questo momento febbre (38°, 38°-5) al mattino, (39°, 39°-5) la sera. Ventre gonfio, costipazione, feci scolorite contenenti bucce intatte. Inappetenza, sete, sonnolenza. La milza poco aumentata di volume, fegato normale. La regione epatica ed epigastrica leggermente dolenti alla pressione. L'ottavo giorno queste gravi condizioni tendono a mitigarsi. Le urine ritornano normali, la febbre scompare, la tinta itterica va sbiadendosi. È da rilevarsi però, che mentre tutto volge al termine, l'impulso cardiaco si mantiene intenso ed energico per qualche giorno (Girotti).

II. — S... G... ha tre figli che in anni diversi ammalarono di favismo, con esito letale per due di essi.

I primi due dell'età di 13 e 15 anni si curarono con tonici, eccitanti. Il primo morì entro 12 ore, ed il secondo sette mesi dopo. Al terzo di anni 10 si somministrò prima latte in gran copia, che venne vomitato insieme alle poche fave ed a gran quantità di bile verde; e poscia il rabarbaro.

Guarì nell'ottavo giorno.

III. — T.. A... G... di G..., d'anni 14, studente. Tanto i genitori, quanto i fratelli e le sorelle, tollerano benissimo l'odore delle fave e possono mangiarne impunemente gran quantità. L'avola materna andava frequentemente soggetta al favismo. Perdette in pochi giorni un suo fratellino, dell'età di un anno e $^{1}/_{2}$, per averlo la madre trattenuto alquanto in un campo di fave in fiore. L'individuo in discorso è di forte costituzione, non è anemico, nè linfatico, non soffre di nervi, mangia molto e digerisce benissimo. Soffrì rare volte febbri malariche, ed ha sempre ben tollerato i sali di chinina. Prova grandissima ripugnanza per l'odore dei fiori delle fave, non riceve spiacevole impressione dal profumo degli altri frutti o fiori. Se per caso gli vien fatto di passare anche in lontananza di un campo di fave in fiore, deve fuggire in fretta a cagione, come egli dice « *di quel maledetto odore* ». È ghiotto delle fave, ma si astiene, per quanto gli è possibile, dal mangiarne. Nel maggio 1899, per essersi esposto in campagna all'azione dell'odore dei fiori delle fave, cominciò subito ad accusare un malessere generale, somma prostrazione di forze; il polso si fece piccolo e celere; il respiro frequente, la temperatura s'elevò al disopra dei 39°. In seguito si lamentò di forte cefalgia frontale, di dolori alla regione cardiaca e a quella epigastrica. Aveva ripugnanza al cibo e sete intensa. La lingua si presentava arida e gialla ed era assalito da frequenti vomiti biliari. Le urine emesse, dapprima gialle, in seguito assunsero un colore rosso-bruno. Le materie fecali avevano colore giallastro. La pelle si presentava di una tinta giallo-itterica, le sclerotiche lievemente giallastre; le mucose visibili molto pallide. Presenta ingrandimento della milza e del fegato. Verso la fine dell'inverno dello scorso anno, per avere mangiato poche fave secche, venne, dopo circa 12 ore, colto da favismo, però in grado leggero. Presentò allora prostrazione di forze, sete, lingua pallida e patinosa, nausea, inappetenza, leggero dolore alla regione epigastrica, colore subitterico, urine giallo-oscure. Nel maggio del corrente anno si astenne completamente dall'andare in campagna per paura dell'odore delle fave, mangiandone però in casa

una gran quantità senza risentirne in principio alcun danno, finchè dopo qualche giorno cominciò ad accusare malessere ed a farsi giallo: ebbe allora vomiti, febbre leggera, dolori all'epigastrio. Emise urine e feci giallastre. Non ebbe cefalgia frontale.

IV. — S... M..., di anni 55, vedova, donna di casa. Ha due figli sani, i quali tollerano benissimo le fave. È stata sempre sana, non sofferse mai di febbri malariche. Tollera benissimo i chinacei. Non ha avuto parenti prossimi i quali abbiano presentato sintomi di intolleranza alle fave, ed essa stessa fino a tre anni fa non aveva mai sofferto di favismo. D'allora tutti gli anni, nella primavera, viene improvvisamente colta da questa malattia, tostochè respira le esalazioni odorifere dei fiori delle fave. Tollera benissimo l'odore degli altri fiori e frutti. È ghiotta delle fave fresche, ma si astiene dal mangiarne, per paura di prendere la malattia. Dalle fave secche non risente alcun nocumento. Verso la fine dello scorso maggio, essendosi recata in vicinanza di un campo di fave in fiore, si sentì venir meno, si fece pallida in volto, venne presa da vertigine e da cefalgia frontale Trasportata in paese, il giorno dopo trovossi in preda a febbre alta, a vomiti frequenti di sostanza biliare, a vaghi dolori articolari. Il cuore batteva irregolarmente ed assai affrettato, il polso era debolissimo e frequente, le urine avevano un colore rosso-nerastro. La milza si palpava bene al disotto dell'arcata costale, ed il fegato si mostrava anch'esso alquanto ingrandito.

V. — B... R..., di anni 9. Ha un fratello maggiore, il quale tutti gli anni, in primavera, va soggetto a favismo. Egli, fin dai primi anni d'età, mostrò sempre intolleranza all'odore dei fiori di fave e del seme verde; quasi tutti gli anni va soggetto a favismo, il quale più volte lo mise in pericolo di vita. Appetisce le fave fresche e le mangia cotte, senza risentirne gli effetti dannosi. Non ebbe altre malattie d'importanza; non ebbe mai febbri malariche, e le poche volte che gli venne somministrato del chinino lo tollerò sempre bene. Non riceve spiacevole impressione dall'odore degli altri fiori o frutti. Negli ultimi giorni dello scorso maggio, per le esalazioni odorifere dei fiori e delle fave fresche, venne rapidamente colto da grave favismo. Visitato, si trovò in preda a sintomi di depressione cardiaca, a vomiti ostinati, a sete intensa, a brividi di freddo, a febbre piuttosto alta, a dolori articolari ed epigastrici. Le urine presentavano un colore rosso-bruno, la lingua era patinosa e arida ed il polso debolissimo e celere. La milza ed il fegato si palpavano bene ed erano dolenti alla pressione. Il respiro era superficiale e frequente.

VI. — C... G... di G..., di anni 17. I genitori sono viventi e godono buona salute. La madre tollera male le fave, ed un suo fratello minore quasi ogni anno si ammala di favismo. È di costituzione piuttosto debole, anemico. Non soffre presentemente di febbri malariche, le sofferse però più volte negli anni passati; prese del chinino in gran quantità e non presentò mai fenomeni d'intolleranza per questo farmaco. Fin da bambino, quasi ogni primavera, si ammala di favismo, prodotto dalla sola azione delle esalazioni odorifere dei fiori e delle fave fresche. Mangia volentieri le fave, delle quali è ghiotto, e non ne risente alcuna azione nociva. Tanto in campagna, quanto in casa, tostochè sente l'odore delle fave, vien subito colpito da ce-

falgia frontale, da vaghi dolori articolari, da nausea e vomiti, da debolezza generale. Emette urine di colore rosso, assume una tinta subitterica, e la temperatura si eleva al disopra del normale. Nei primi di maggio del corrente anno fu trovato affetto dalla solita intossicazione fabica, in forma piuttosto grave, e presentò allora i sintomi stessi suaccennati.

VII. — S... P... P... G..., d'anni 16, pastore. È di buona costituzione, ha lo stomaco sano, mangia molto e digerisce bene. Andò soggetto più volte a febbri malariche e tollerò sempre bene i sali di chinina. Fin da bambino è stato sempre intollerante all'odore di fiori di fave, mentre non risente alcun effetto nocivo dal profumo emanato dagli altri fiori. Quasi tutti gli anni, nella primavera, viene colto dalla malattia più per azione delle esalazioni odorifere dei fiori che per ingestione di fave fresche, poichè si astiene dal mangiarne. I sintomi che presenta sono: depressione somma di forze, vertigine, cardiopalmo, cefalgia frontale, dolore all'epigastrio, lingua arida, vomiti biliari, sete, urine rosse, feci giallognole, febbre altissima, ingrossamento di milza. Durante il decorso della malattia, gli venne dalla madre somministrata una buona dose di bisolfato di chinina, perchè impressionata dall'alta temperatura che presentava l'infermo, e non ne risentì alcuna azione nociva. L'ammalato, in quel tempo, era immune da malaria. Non viene colpito dal favismo per ingestione di fave secche, però se queste vengono messe, prima di cuocerle, a macerare nell'acqua fredda, a causa dell'odore che si sviluppa, prova stordimento, spossatezza e leggeri dolori articolari.

VIII. — S... A..., d'anni 40, agricoltore. È dotato di valida costituzione, ha gli organi digestivi normali e non ha mai sofferto di nervi. Ebbe rare volte febbri intermittenti, e non ha mai presentato sintomi d'intolleranza per i sali di chinino e per l'odore dei fiori, ad eccezione di quelli delle fave. Viene colto dal favismo soltanto per l'azione del profumo delle fave, non risentendo alcun nocumento per l'ingestione delle medesime. Il giorno 28 maggio venne colpito da intossicazione fabica. Presentava prostrazione somma di forze, vertigini, stordimento, brividi di freddo, cefalgia frontale, lingua impatinata, sete intensa, vomiti biliari, dolori articolari ed epigastrici, colorito itterico, leggero tumore di milza e di fegato; la temperatura ascellare saliva a 39°,3, le urine erano sanguinolenti.

IX. — R... F..., bambino di 3 anni, dotato di sana e robusta costituzione, nato da genitori sani. Nessuna malattia pregressa del tubo digerente, della ghiandola epatica, delle vie biliari o in altri organi. Presentava un'itterizia classica della pelle e delle congiuntive. Gli occhi fissi e spalancati; non rispondeva alle insistenti domande rivoltegli; il polso piccolo ed intermittente faceva temere una prossima catastrofe. Il termometro rilevava leggerissimo aumento termico; le urine cariche di sangue. Lo stato fisiologico degli organi addominali del bambino, l'aspetto florido, la lieve elevazione termica, non erano in rapporto con la grave itterizia sorta improvvisa, col polso e con l'ematuria. In primo tempo temendo si trattasse di malaria, si praticò una iniezione di chinino; soltanto dopo indagini si venne a capo della vera causa constatando che il fanciullo in qualche ora della giornata si era trastullato con delle piante di fave. Siccome il padre quando frequentava campi seminati a fave soffriva di ematuria, così si deve concludere

per una predisposizione ereditaria nel bambino. Sul momento vennero somministrate delle piccole bibite di cognac e brodi concentrati per sollevare le forze dell'ammalato. Dietro l'uso di purganti colagoghi evacuò poche materie fecali, e due lombricoidi che non erano sufficienti a dar ragione di tutti quei disturbi funzionali. Dopo diversi giorni l'itterizia scomparve completamente, e l'urina si fece chiara.

X. — A due bambini di un anno lattanti che non mangiarono naturalmente mai, fave fresche, il favismo fu comunicato coll'allattamento delle madri affette da questa malattia. Entrambi i fanciulli presentarono una tinta giallo-verdastra in tutta la persona, più marcata alla faccia e sclerotiche, orine torbide quasi rassomiglianti a feci vinose, che dopo tre giorni tornarono limpide, febbre 38°. 5, fegato alquanto ingrossato, milza normale. La cura fu sciroppo di rabarbaro ed euchinina. Durata della malattia da 6 ad 8 giorni.

XI. — Il pretore C... per certe verifiche di stato dovette un giorno attraversare un campo di fave. Il dì seguente fu colto da brividi di freddo e da febbre. L'indomani poi si manifestò un'itterizia per tutta la persona, nausea, propensione al vomito, inappetenza con stanchezza e sonnolenza invincibile. Trattasi di favismo. L'infermo all'età di 7 anni ammalò dello stesso morbo. Le urine si presentavano torbide del colore del vino rosso corrotto, il fegato alquanto ingrossato, milza normale, febbre 38°. La cura consistè in un purgante, chinino, sciroppo di rabarbaro e cartine di salolo. Al quinto giorno guarì.

XII. — Un bambino al tempo della fioritura delle fave presentava itterizia, somma prostrazione, cefalgia; rifiutava il cibo, urinava sangue. L'anno seguente nello stesso mese presentò un simile quadro sintomatologico. L'anno successivo ancora presentò itterizia, prostrazione di forze, convulsioni, urina abbondante e sanguinolenta. Dopo alcune ore morì.

Già dalla storia dei casi clinici studiati si potrebbe ritenere il favismo come un'affezione non infettiva, ma semplicemente tossica, prodotta sia dalle esalazioni dei fiori di fave, sia dalla ingestione dei frutti specialmente verdi e crudi di questa pianta.

Questa intossicazione speciale interessa prevalentemente il sistema nervoso, il sistema circolatorio, i globuli rossi, il tubo digerente, il fegato ed i reni.

Generalmente gli ammalati guariscono; difatti dal numero dei decessi, contenuti nelle storie dei casi da me raccolti, non risulterebbe che una mortalità massima dell'8 per cento.

IV.

Sintomatologia.

Presenterò ora il quadro sintomatologico del favismo, come risulta dai numerosi casi da me raccolti e solo in parte riportati:

TEGUMENTI. — Colorito subitterico nei casi leggerissimi; giallo zolfo estensibile alle mucose visibili nei casi leggeri e giallo oscuro nei casi gravi.

SISTEMA NERVOSO. — Malessere generale; prostrazione di forze, cefalgia, specialmente frontale, fotofobia, dolori articolari, stordimento, vertirgini, sonnolenza, deliquio.

SISTEMA CIRCOLATORIO. — Polso debole, piccolo, frequente, cardiopalmo, qualche volta cardialgia; talora soffi anemici al primo tono; in un caso fu osservato diminuzione dei corpuscoli rossi ed aumento dei leucociti. Spessissimo si ha febbre da 38° a 39. 5 con brividi di freddo.

SISTEMA RESPIRATORIO. — Nulla di particolare: talora si ha un aumento, talora una diminuzione nel numero delle respirazioni.

MILZA. — Qualche volta dolente alla palpazione e talora ingrandita. Non dimentichiamo peraltro che spesso si ha che fare con individui, che hanno sofferto di malaria.

SISTEMA DIGERENTE. — Inappetenza, sete, nausea, lingua patinosa, talora arida, vomito spesso con bile, epigastrio dolente, diarrea e talora costipazione, tensione dell'addome, feci talora più, talora meno colorite del normale.

FEGATO. — Talora ingrandito e più spesso dolente alla palpazione.

URINA. — Spessissimo ematuria, talora soltanto albuminuria ed emoglobinuria; qualche volta si trovano cilindri epiteliali, qualche altra si ebbe la reazione di Gmelin. In qualche caso si ebbe incontinenza in qualche altro ritenzione d'urina. Densità da 1016 a 1023.

I sintomi caratteristici di questa malattia sono per altro: Itterizia, ematuria od emoglobinuria.

V.

Periodo d'incubazione.

Dalla rivista dei casi clinici studiati, risulta che un vero e proprio periodo d'incubazione manca nel favismo inquantochè è dato soltanto da poche ore e solo eccezionalmente si protrae per un paio di giorni.

L'incubazione è sempre più breve quando si contrae il favismo per inalare le esalazioni dei fiori (da 2 a 6 ore circa), che per ingerirne i frutti (da 1 a 2 giorni).

Questo fatto mi è confermato anche da un'inchiesta da me aperta in proposito tra gli ufficiali sanitari della Sardegna: inchiesta che come tante altre conservo per chi desideri notizie ulteriori, spiacente di non poterle pubblicare, perchè aumenterebbero troppo la mole del lavoro.

VI.

Vie d'intossicazione.

1. *Si contrae il favismo più per ingestione delle fave fresche o più per inalazione delle sostanze volatili contenute nelle medesime?* — Dai casi clinici studiati risulta che la maggioranza degli individui predisposti contraggono il favismo indifferentemente tanto per mangiare fave fresche, crude o cotte, quanto per inalare il profumo delle medesime.

Un calcolo molto approssimativo ci darebbe il 13 °/₀ circa di individui che non contraggono il favismo per ingestione ed il 2 °/₀ che non lo contrae per inalazione. Da un'inchiesta aperta tra gli ufficiali sanitari della Sardegna invece risulterebbe che si contrae il favismo più per ingestione che per inalazione e precisamente su 1211 casi di favismo se ne ebbero 752 per ingestione e 459 per inalazione, cioè il numero dei casi *ab ingestis* sarebbe quasi il doppio del numero dei casi avvenuti per inalazione.

Ad ogni modo se si possano o no distinguere delle forme di favismo *ab ingestis*, *ab olfactu* e *ab inalatione* diverse nella sintomatologia e nella lunghezza del periodo di incubazione, si deciderà in seguito.

2. *Si contrae il favismo da inalazione soltanto per un'azione diretta sulla mucosa olfattiva cioè* ab olfactu *od anche inspirando il profumo a narici chiuse?*

ESPERIENZA I. — Scelsi a questo scopo 6 individui, tre predisposti al favismo e tre immuni, e li condussi in un campo di fave in fioritura ove li

tenni per mezz'ora. Ecco quanto osservai: I tre predisposti accusarano poco dopo una leggera cefalgia, senso di calore e leggero malessere. Uno poi risentì stordimento, tanto che fu costretto a sedersi per terra, mancandogli le forze; per cui fu subito allontanato. I trè immuni invece non ebbero a soffrire nulla.

ESPERIENZA II. — Ripetei con gli stessi individui l'esperienza con l'infuso alcoolico e con l'infuso acquoso di fiori di fave a narici chiuse ed a narici aperte, tacendo loro il nome di detti estratti. I predisposti al favismo appena annusavano gli estratti, sentivano un leggero stordimento accompagnato da ronzio e dopo pochi minuti cefalea, indicandomi subito il nome della sostanza che facevo loro odorare; mentre gli immuni non solo non risentivano alcun effetto nocivo, ma richiesti di quanto fiutavano non riuscivano ad indovinare.

A naso chiuso poi tanto negli uni come negli altri non ho notato, usando sempre gli infusi, alcun effetto.

ESPERIENZA III. — Volendo ripetere su questi ed altri le esperienze, ebbi da tutti un rifiuto, perciò mi rivolsi alla cortesia del distintissimo dottor Coda, affinchè volesse provarmi detti estratti in alcuni suoi ammalati tanto a naso chiuso, quanto a naso aperto. Egli ottenne presso a poco gli stessi risultati da me osservati.

Ecco quanto cortesemente mi rispose:

« Ho fatto l'esperienza su quattro individui molto prediposti al favismo, facendo loro tenere il naso ben chiuso, e facendo loro respirare con la sola bocca, l'infuso alcoolico di fave. Di essi uno soltanto provò nausea, stordimento, cefalea. Fo notare però, che costui mi disse d'aver risentito l'odore, mentre gli altri no: siccome il naso lo tenevano ben chiuso tutti, v'è da supporre che in questo caso non sia affatto estranea la suggestione ».

ESPERIENZA IV. — Ripetè poi l'esperienza, sempre da me pregato, su altri individui, tanto predisposti al favismo, quanto immuni, ed ecco quanto egli scrive: « Scelsi individui completamente immuni al favismo, ed altri che vi vanno soggetti ogni anno. Ho fatto fiutare a tutti indistintamente, per un minuto, l'infuso alcoolico di fiori di fave. Tutti quelli refrattari non riscontrarono ripugnanza nè seppero dire quale era la sostanza che fiutavano, avendone a tutti taciuto il nome; mentre i predisposti, appena avvicinata la sostanza al naso, voltarono la faccia con senso di disgusto e si accorsero all'istante trattarsi dell'odore di fave. Nessunno dei refrattari dimostrò intolleranza, mentre gli altri, pochi eccettuati, accusarono calore alla testa, pulsazione alle tempia, leggera cefalea frontale, stordimento ed alcuni di essi subitanea prostrazione ».

Ricorderò che in quasi tutte queste esperienze ottenni la chiusura delle narici mediante pinzette speciali di legno costruite appositamente.

Che certe impressioni per mezzo del naso e rispettivamente dei nervi olfattivi possano produrre dei riflessi e delle *irradiazioni* generanti dei seri disturbi nelle varie funzioni e sui vari organi del corpo animale, è a tutti noto.

È ben nota l'esperienza dell'arresto del cuore e del respiro, che si produce nel coniglio avvicinando al muso dell'animale una spugna impregnata di cloroformio o di ammoniaca. In queste circostanze è l'azione irritante della sostanza che per via riflessa eccita il nervo vago; manca infatti ogni manifestazione se per mezzo di una soluzione di cocaina si rende insensibile la mucosa nasale, o se si somministra all'animale dell'atropina che paralizza le estremità intracardiache del vago.

Si sa che dei fenomeni riflessi del naso possono determinare asma, vertigini, palpitazione, tachicardia, accessi epilettici e iperestesie delle fauci e della faringe.

È noto che le lesioni del naso possono, per mezzo dei nervi cervicali, produrre infiltrazioni edematose dei muscoli occipitali, consistenti in angio-paralisi riflesse.

Rossbach osservò che un forte raffreddamento (mediante una compressa con ghiaccio) delle pareti addominali in un coniglio può produrre un'anemia delle vie aeree.

Pure note sono le relazioni fra mucosa del naso e raffreddamento dei piedi; in questo caso i disturbi circolatori prodotti dalla sensazione di freddo determinano alla loro volta un raffreddamento, che agisce poi da stimolo sulla mucosa nasale, producendo lo sternuto.

Ricorderò ancora come il Theilhabier mediante stimoli della mucosa nasale riuscisse a determinare intense anemie nell'intestino, e come il Frank ottenesse nei cani, gatti e conigli disturbi della circolazione e del respiro, spasmo della glottide e dei bronchi, costrizione dei vasi del capo ed una vasodilatazione dal lato operato.

Non voglio dimenticare infine come l'eccitamento meccanico della mucosa nasale possa nelle cagne produrre delle contrazioni uterine (Schiff), e nelle donne contrazioni dell'utero e avvicinamento delle trombe del Falloppio (Linder).

Dopo tutti questi fatti e dopo tutto quanto si sa sugli effetti prodotti dall'azione dei profumi, non è più il caso di meravigliarci se le emanazioni delle fave riescono a produrre gran parte dei sintomi costituenti il quadro morboso del favismo, specie quando ci troviamo in presenza di speciali iperestesie del naso.

3° *Viene il favismo prodotto anche dalla ingestione di fave secche?* — Le fave secche come risulta dai casi clinici riportati producono il favismo soltanto eccezionalmente ed in forma leggerissima. Sembra che coll'essiccamento diminuisca il misterioso potere tossiso. Avverrebbe qualcosa di simile a ciò che accade per le spongiole, le quali,

mentre fresche producono disturbi simili a quelli osservati nel favismo, disseccate perdono la tossicità.

Anche la grande maggioranza degli ufficiali sanitari da me interpellati tenderebbe a confermare ciò. Difatti soltanto 5 su 45 osservarono casi di favismo per ingestione di fave secche.

4° *È possibile la trasmissone della malattia per mezzo dell'allattamento naturale?* — Dai casi clinici studiati risulta che qualche volta la madre affetta da favismo può comunicarlo al bambino, per mezzo del latte; ciò s'accorda anche colle risposte ottenute da una inchiesta aperta in proposito fra gli ufficiali sanitari.

VII.

Morbidità e mortalità.

Morbidità. — Quanti individui per ogni mille abitanti ammalarono di favismo in un anno in Sardegna?

Ecco quanto mi risulta da un'inchiesta aperta in proposito tra gli ufficiali sanitari della Sardegna; inchiesta della quale tralascerò per brevità le tavole statistiche:

Si ebbe dal 0.5 al 5 per mille di colpiti in 48 paesi; e precisamente una morbidità inferiore all'1 per mille in 16 e dall'1 al 2 per mille in 17 paesi; dal 5 al 10 per mille in 10 paesi; dal 10 al 20 per mille in 8; dal 20 al 30 per mille in 6.

La media poi della morbidità per favismo studiata nei 72 comuni suddetti fu del 5.17 per mille.

Mortalità. — Relativamente alla mortalità non possiamo riportare che la percentuale da noi già calcôlata dell'8 per cento sui casi clinici raccolti riserbandoci in seguito a controllarla con ulteriori e più complete ricerche.

VIII.

Predisposizione ed immunità.

1. *Predisposizione verso l'azione nociva dei profumi in genere.* — Si è asserito sempre che la predisposizione ha importanza nel risentire l'azione nociva dei profumi.

Quantunque anche individui apparentemente sani possano soffrire per l'azione dei profumi, tuttavia pare che ne siano maggiormente colpiti i nevropatici.

Frére trovò predisposte le isteriche; non così Joal che ha trovato

più predisposte ai riflessi d'origine nasale i nevropatici ed artritici. Il Valentini sostiene che la estrema suscettibilità di certi individui verso alcuni odori non dipende da maggior finezza del loro senso olfattivo, ma che sia d'origine psichica. Le sue ricerche lo portarono a concludere, tra le altre cose, che la iperosmia, anche quando è affermata dall'ammalato, non possa dimostrarsi; per cui tiene in generale ad una illusione dovuta all'esagerazione della reazione psichica.

Non si può assolutamente negare l'importanza della predisposizione al favismo; è notorio infatti come soltanto uno scarso numero d'individui, fra i tanti che inalano il profumo dei fiori di fave od ingeriscono i semi freschi, venga colpito dalla suddetta malattia.

2. *È dimostrabile in genere la predisposizione al favismo?* — A questa domanda non potendo rispondere collo studio soltanto della casistica raccolta, mi convenne approfittare dell'esperienza degli ufficiali sanitari di località affette da favismo. Tralasciando come al solito tutte le singole risposte farò noto come quasi tutti concordemente ammettessero la predisposizione in discorso.

3. *Gli individui predisposti al favismo provano anche una speciale ripugnanza verso l'odore dei fiori ed il gusto dei frutti?* — Dalla casistica raccolta ed in parte riportata risulterebbe che generalmente l'odore dei fiori o delle piante delle fave, più che il gusto, arreca un senso di nausea in coloro che sono predisposti al favismo. Anzi da un calcolo approssimativo ho osservata detta ripugnanza nel 20 per cento dei colpiti. Questo fatto viene anche confermato dalla grande maggioranza degli ufficiali sanitari della Sardegna da me interpellati.

4. *I nevropatici, gli anemici ed i linfatici sono più degli altri predisposti al favismo?* — Sembra di sì, quantunque i sani e robusti possano anche essi ammalare. La gran maggioranza dei medici interpellati contro una piccola minoranza propende per questa opinione. Difatti soltanto 13 contro 50 furono di parere contrario.

5. *S'osserva l'immunità dopo avere sofferto il favismo?* — Pare di no, sembra anzi che questa malattia si ripeta più facilmente in quelli che ne hanno già sofferto altre volte. Vi sono per altro anche dei casi di persone che pur mangiando sempre fave ammalarono una volta sola ed altri che dopo la prima volta stettero da 10-15 anni prima di ammalare ancora una seconda.

6. *Vengono colpiti ogni anno gli stessi individui?* — Generalmente quasi ogni anno sono colpiti gli stessi individui. In questo senso risposero anche quasi tutti gli ufficiali sanitari interpellati.

7. *Recidive.* — Dalla casistica raccolta risulta che nella primavera dello stesso anno le recidive sono possibili, ma rare. Anche l'inchiesta

da me aperta risponderebbe in questo senso. Difatti su 21 colleghi interpellati 10 osservarono recidive nella stessa primavera e 10 no.

8. *Ereditarietà.* — L'ereditarietà ha molta importanza nella predisposizione al favismo. Numerosi sono i casi di famiglie colpite per molte generazioni. Dalla casistica riportata mi risulterebbe l'ereditarietà nel 20 per cento circa. I colleghi interpellati ammisero concordemente l'ereditarietà.

9. *Sesso.* — Non si può stabilire l'influenza del sesso, perchè se anche il maggior numero è dato dai maschi, ciò si spiega col fatto che essi si espongono maggiormente all'azione tossica dei fiori durante la coltivazione e maturazione delle fave.

10. *Età.* — Il favismo colpisce molto più i fanciulli e gli adulti che i poppanti ed i vecchi. Nello stesso senso mi risposero i numerosi colleghi interpellati.

11. *Condizione sociale e professione.* — La maggioranza dei colpiti di favismo è data dai poveri e specialmente dagli agricoltori. Questi coltivano le fave e ne fanno maggior consumo e per la condizione loro presentano maggior predisposizione acquisita ed ereditaria alla suddetta malattia. Pure questo fatto conferma sempre più l'esistenza di un nesso tra favismo e fave.

12. *Malattie pregresse.* — Il fatto che il favismo è più frequente in regioni malariche (Sardegna, Sicilia e mezzogiorno d'Italia) che altrove, e l'altro fatto che la malaria sofferta può lasciare una duratura predisposizione all'emoglominuria chininica, mi condussero al sospetto che detta azione predisponente della malaria si esplicasse anche verso l'intossicazione fabica.

Per dare consistenza peraltro a questa ipotesi, bisognerebbe dimostrare:

1° Che il numero dei colpiti di favismo è maggiore nei luoghi malarici che nei luoghi non malarici, a parità di condizioni riguardo alla coltivazione ed al consumo delle fave;

2° Che in alcuni luoghi nei quali domina la malaria, la percentuale dei colpiti da favismo è maggiore fra i malarici che fra i sani.

Per fare un utile confronto dei colpiti da favismo fra i malarici e i sani, dovrebbe aprirsi un'inchiesta non soltanto in una località eminentemente malarica, come la Sardegna, ma anche altrove; inquantochè sono rari nell'isola suddetta gli individui, che non abbiano mai sofferto di febbri malariche.

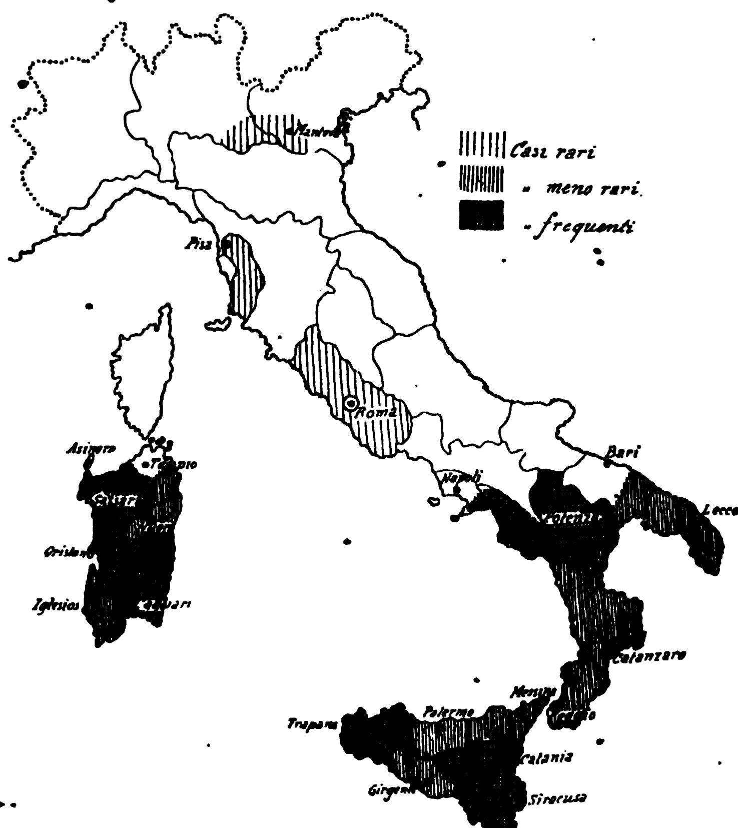
Per varie ragioni non ho potuto per ora interrogare che gli ufficiali sanitari della Sardegna, dei quali 35 ammisero un'azione predisponente della malaria e 55 rimasero in dubbio o l'esclusero.

Dai numerosi fatti sparsi nella lunga serie di casi clinici studiati risulterebbe, è vero, come gli individui predisposti all'intossicazione fabica non lo siano per nulla all'intossicazione chininica (1); ma ciò non può parlare contro l'ipotesi in discussione; perchè anche gli individui predisposti all'ematuria da strapazzo non lo sono per nulla a quella da freddo e viceversa.

IX.

Diffusione del favismo in Italia.

Tanto per dare un'idea della diffusione del favismo in Italia, ho creduto bene tracciare un cartogramma in proposito.



(1) Tuttavia il dottor Pietro Pucci (*Gazzetta degli Ospitali*, 1896, N. 40), riporta casi di favismo con intolleranza al chinino ed altri nei quali questo farmaco esagerava i sintomi del favismo.

Non si poteva per ora far nulla di più esatto a cagione della scarsità ed incertezza dei dati che su questa malattia pur con tanto stento ho potuto raccogliere.

Da questo cartogramma (fig. 1ª) risulterebbe quanto segue (1):

1. *Tra le regioni d'Italia più colpite dal favismo vengono anzitutto la Sardegna, poi la Sicilia, indi le Provincie più meridionali.*

2. *Non mancano casi nella provincia di Roma, di Pisa e di Mantova.*

3. *Riguardo alla Sardegna, se si eccettua la regione del Tempiese, ove i casi scarseggiano, si può dire che il favismo sia diffuso più o meno ovunque. Le regioni di Nuoro, di Terranova Pausania e di Iglesias sembrano un po' meno colpite delle altre.*

4. *Il favismo pare predominante in genere nelle regioni più colpite dalla malaria, dove però si fa estesa coltivazione di fave.*

Pure a confermare il nesso tra favismo e fave, concorre il fatto che la maggior diffusione si ha in quelle località ove ne è maggiore la coltivazione ed il consumo.

Quali sono le cause che regolano la diffusione del favismo in Italia? — Fra le divere ipotesi che possono farsi a questo proposito possiamo pensare:

1° Ad un maggiore o minore consumo di fave;

2° All'influenza del terreno e del clima sulla tossicità delle medesime;

3° A cause predisponenti che agiscono sulle popolazioni colpite dal favismo, come ad esempio la malaria.

1. *Consumo delle fave.* — Già dal cartogramma rilevasi come la diffusione del favismo coincida colla maggior. coltivazione di fave, ciò che appunto si osserva nelle Isole e nell'Italia meridionale.

2. *Influenza del terreno e del clima.* — È noto, è vero, che la quantità dei principii speciali di una stessa pianta (alcaloidi, essenze, ecc.) varia secondo il periodo di vegetazione e secondo l'ambiente in cui si coltiva, ma se si riflette che in Sardegna, come altrove, il favismo è diffuso nei terreni più disparati, si sarebbe indotti ad abbandonare il sospetto di una semplice influenza del terreno sulla eventuale tossicità delle fave.

(1) In alcune località, che nel cartogramma sono segnate come infette da favismo, il più delle volte non si osservò che qualche caso sparso qua e là. Questo dico affinchè non si creda che tutte le località segnate siano completamente colpite dal favismo. Così nella provincia di Roma fu osservato il favismo soltanto nel comune di Formello ed in qualche altro (DE CAMILLIS, *Rivista medica*, agosto 1901).

Così riguardo al clima si sa, per esempio, che una temperatura molto elevata o molto bassa sopprime in generale più o meno completamente gli odori; che la propagazione si fa meglio sotto l'influenza d'una temperatura moderatamente elevata; che i fiori delle regioni più calde emanano odori più forti ed in maggior quantità di quelli delle regioni fredde; che l'intensità d'espansione delle molecole odorose, è in ragione diretta dell'umidità contenuta nell'atmosfera; ma tutte queste nozioni ci trattengono pur sempre nel campo di semplici ipotesi.

3. *Influenza di speciali cause predisponenti, che agiscono sulle popolazioni colpite da favismo.* — Pur non dimenticando che tra gli abitanti dei paesi caldi e quelli dei paesi freddi si notano delle differenze nella recettività a varie affezioni e nella sensibilità ai vari agenti fisico-chimici, tuttavia noi non ci occuperemo per ora che dell'ereditarietà e della malaria.

a) *Ereditarietà.* — Ho già accennato altrove come l'ereditarietà eserciti una certa influenza nella predisposizione al favismo.

b) *Malaria.* — Ho pure parlato di siffatta questione; vedemmo che il favismo predomina in luoghi malarici, ma non potei dimostrare che esista una vera relazione tra malaria e favismo. Anzi l'epoca della maggior morbidità per quest'ultimo, aprile, maggio e giugno, coincide proprio coll'epoca della minor morbidità per malaria. Peraltro non sono ancora riuscito ad abbattere l'ipotesi che la malaria (anche da tempo sofferta) possa predisporre all'intossicazione fabica come predispone alla chininica.

X.

Terapia

Sempre per poter penetrare la natura di questa singolare malattia credetti utile di tener presente anche tutto ciò che si sa circa la terapia della medesima. Nella cura di questa affezione si osserva l'azione benefica dell'uso degli eccitanti, dei tonici e dei purganti.

L'alcool esercita una favorevole influenza; è preso con piacere dagli infermi ed è ben tollerato. Esso eccita l'attività cardiaca e si oppone così alla minacciante sincope. Ciò risultò chiaro pure da una inchiesta aperta tra gli ufficiali sanitari, la quale tralascio per brevità.

La terapia del favismo avvalora sempre più l'ipotesi della natura tossica di questa malattia. Allo stesso trattamento, infatti, si assog-

gettano, come vedremo, gli individui affetti da tante altre intossicazioni simili prodotte parimenti da inalazioni di essenze o da ingestioni di parti di speciali vegetali.

IX.

Esperienze sul favismo istituite sull'uomo e sugli animali.

1. Preparazione dei distillati di fave.

In un pallone venivano messi gm. 500 di fiori o di frutto o di bucce di fave minutamente tagliuzzati e si collocava in un bagnomaria alla temperatura di 60° C. Il vapore d'acqua prodotto in un secondo pallone passava per il primo asportando le sostanze volatili delle fave per venire condensato mediante un refrigerante e raccolto in un matraccio.

2. Esperienze istituite col distillato di fiori per inalazione sull'uomo.

A M... B... e G... suo figlio d'anni 5 faccio odorare del distillato di fave senza dire che cosa contenga la bottiglia. La madre non indovina a qual pianta appartenesse il profumo e si lamenta di capogiro. Il figlio dopo 5 minuti si mostra irrequieto, e s'allontana appena gli metto sotto il naso il predetto distillato.

Lasciai e continuai l'esperimento il giorno successivo. Appena rimetto questa volta il distillato sotto il naso alla madre, questa subito mi dice trattarsi di profumo di fave. Il fanciullo che prima dell'esperienza era calmo, mostra dopo 5 minuti l'irrequietezza del giorno precedente, più un senso di ebbrezza accompagnata da pianto. Dopo questo fatto lasciai il figlio e continuai l'esperienza con la madre, la quale non si lamentò che d'un senso di pesantezza alla testa, con leggera cefalea, capogiro e nausea. Sospesi l'esperienza e l'indomani recatomi da lei per continuarla, la trovai a letto. Chiesta del perchè, mi disse che un'ora dopo la mia partenza, fu presa da vomito e da malessere, sì da essere costretta a mettersi a letto. Nella notte sofferse d'insonnia e di cefalea. Nel momento della mia visita non risentiva altro che una pesantezza alla testa ed inappetenza, credetti opportuno amministrare un eccitante, dopo il quale incominciò a star bene, e l'indomani, con l'aiuto d'un purgante, ritornò allo stato normale.

3. Esperienze istituite sugli animali per inalazione dei distillati (1) di fiori.

Esperimenti col distillato di fiori di fave su due topolini albini, del peso ciascuno di gm. 11 e su due topolini neri uno del peso di gm. 18 e l'altro di gm. 24.

(1) Il prof. Bernabei di Siena, iniettò nelle vene e sotto cute di conigli, cavie, l'estratto acquoso di fave fresche e secche. Da queste esperienze detrasse d'aver ottenuto più la forma di un catarro intestinale *ab ingestis*, che una vera intossicazione.

Ore 8 1/2. Metto detti topolini albini e neri in due distinti vasi. In altro vaso due topolini albini di confronto. Introduco in ciascuno dei primi vasi un batuffolo di cotone inbevuto ciascuno di 5 cmc. di infuso di fiori.

Ore 9. 10′. I topolini albini tentano con salti allontanarsi da detto batuffolo. I topolini neri non presentano nionte d'anormale.

Ore 9. 20′. Verso altri 5 cmc. di detto distillato; negli albini si accentua l'irrequietezza; i neri incominciano a reagire, anche con salti tentano allontanarsi dal batuffolo.

Ore 10. 25′. I topolini albini sono abbattuti; anche uno dei neri reagisce poco.

Ore 11. 10′. Continua l'abbattimento; messi fuori del vaso, dopo cinque minuti incominciano a rimettersi.

Ore 11. 30′. Altri 5 cmc. di distillato.

Ore 11. 35′. Topolini bianchi: tremito, paresi; in uno narcosi; topolino nero: gli stessi fenomeni; allontanati e tolti dal vaso dopo alcuni minuti incominciano a rimettersi.

Ore 12. 15′. Versati altri 5 cmc. di distillato.

Ore 12. 20′. Abbattimento in tutti e quattro i topi, tanto negli albini che nei neri; i più piccoli sono in narcosi, dispnea, leggeri sussulti; i più grandi sono eccitati, reagiscono lentamente agli stimoli.

Ore 12. 40′. Un topolino albino e il topolino nero di 18 grammi muoiono. Nella sera, ore 4 1/2 muore anche l'altro topolino albino.

4. Esperienze istituite sopra gli animali col distillato dei fiori per via ipodermica (1).

A) *Esperienze sulle rane.*

ESPERIENZA I. — 6 maggio 1904. Rana esculenta, peso gm. 15.

Ore 11. 45′. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato di fiori.

Ore 11. 50′. Perdita completa di movimenti volontari, di cui è appena accennato il palpebrale. Aperta la rana non da segni di vita; si vede che il cuore continua a battere con 30 pulsazioni al minuto.

Sistole incompleta, diastole normale. Nella sera muore; cuore fermo in diastole; sangue nulla d'anormale.

ESPERIENZA II. — 6 maggio 1904 (sera). Rana esculenta, peso gm. 26.

Iniezione sottocutanea di 1/3 di cmc. di distillato di fiori.

Ore 3. 50′. Respirazione normale. Abolizione dei movimenti volontari e riflessi, di cui esiste solo il palpebrale.

Ore 4. 15′. Si rimette; eccitata, tenta fare un salto ma non riesce; la contrazione degli arti è poco valida, capovolta si rimette a poco a poco nella posizione normale.

Ore 4. 25′. L'animale è pressochè in condizioni normali.

ESPERIENZA III. — 7 maggio 1904. Rana esculenta gm. 22.

Soluzione di 1/2 cmc. di distillato di fiori e 1/2 cmc. di acqua distillata.

(1) Questo gruppo di esperienze fu fatto nel laboratorio di farmacologia, diretto dal prof. Giusto Coronedi, della cui cortesia sentitamente ringrazio.

Ore 4. 25′. Iniezione sottocutanea di 1/2 cmc. di detta soluzione.

Ore 4. 27′. Irrequietezza.

Ore 4. 30′. Dispnea, sonnolenza; capovolta non reagisce.

Ore 4. 54′. Respirazione poco accentuata, torpore generale.

Ore 5. 10′. Incomincia a rimettersi, la respirazione si fa più accentuata, reagisce alquanto eccitata, riflessi palpebrali conservati, tuttavia capovolta non riesce a mettersi nella posizione normale.

Ore 5. 20′. Migliorata la motilità, respirazione normale, eccitata, fa dei piccoli salti, ma riesce a stento a ricondurre gli arti posteriori nella posizione abituale.

Ore 5. 35′. Reagisce, ma con lentezza; salta quasi in maniera normale.

Ore 5. 37′. L'animale è normale.

Esperienza IV. — 8 maggio 1904 (mattina). Rana esculenta, peso grammi 22.

Soluzione di 1/2 cmc. di estratto di fiori, e 1/2 cmc. di acqua distillata.

Ore 9. 20′. Iniezione ipodermica di detta soluzione.

Ore 9. 30′. Gli stessi sintomi della rana precedente.

Ore 9. 40′. Paresi.

Ore 9. 50′. Lo stesso.

Ore 10. 10′. Leggeri movimenti, eccitata, reagisce alquanto; capovolta non riesce a mettersi nella posizione normale.

Ore 10. 20′. Eccitata, fa qualche piccolo movimento tenta camminare, fa qualche centimetro trascinandosi gli arti posteriori.

Ore 11. 5′. S'è rimessa quasi completamente.

Esperienza V. — 8 maggio 1904 (sera). Rana esculenta, peso gm. 22.

Ore 4. 30′. Iniezione ipodermica di 1 cmc. d'estratto di fiori.

Ore 4. 35′. Immobilità, sonnolenza, riflesso palpebrale conservato.

Ore 4. 50′. Eccitata, non reagisce, respirazione nulla; esaminato il sangue al microscopio, nulla d'anormale.

Ore 4. 55′. Morte, cuore fermo in diastole. Sangue, esaminato al microscopio, normale.

B) *Esperienze sui topolini bianchi.*

Esperienza I. — 6 maggio 1904. Topolino bianco, peso gm. 22.

Ore 5. 20. Iniezione sottocutanea di 1 cmc. di distillato di fiori.

Ore 5. 25. Stato di eccitazione generale, con tremito.

ore 5. 27. Perdita dei movimenti volontari, dispnea marcata, riflesso palpebrale conservato. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato.

Ore 5. 55. Animale immobile, in stato di risoluzione muscolare generale, non reagisce più agli stimoli, manca ancora il riflesso palpebrale, dispnea intensa, morte. Il cuore è fermo in diastole; all'esame del sangue non dimostra nulla d'anormale. Polmoni iperemici, fegato congesto, nei reni non si vede più netta la distinzione tra la corticale e la midollare, quest'ultima si mostra fortemente congesta.

Esperienza II. — 6 maggio 1904 (sera). Topolino bianco, peso gm. 26.

Ore 3. 30. Iniezione ipodermica di un terzo di cmc. di distillato di fiori.

Ore 3. 35. Immobilità, dispnea, riflesso palpebrale conservato.

Ore 3. 50. Incomincia a rimettersi, manca la dispnea, sono conservati i riflessi.

Ore 3. 55. Normale.

Esperienza III. — 7 maggio 1904 (mattina). Topolino bianco, peso gm. 24.

Ore 11. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato di fiori.

Ore 11. 5. Dispnea, eccitazione generale, scosse tonico-cloniche.

Ore 11 ·20. Conservati i riflessi, giace sul fianco, perdita della mobilità.

Ore 11. 30. Niente d'anormale, l'animale è quasi ristabilito.

Ore 12. Normale.

Esperienza IV. — 7 maggio 1904 (sera). Topolino bianco, peso gm. 26.

Ore 4. 40. Iniezione ipodermica di 1 1/2 cmc. di distillato di fiori.

Ore 4. 45. Dispnea, stato d'eccitazione generale con tremito, scosse clonico-toniche, riflesso palpebrale conservato.

Ore 4. 55. Paresi spastica arti anteriori e posteriori, marcata la dispnea.

Ore 5. 10. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato di fiori.

Ore 5. 15. Accentuazione delle scosse tonico-cloniche, dispnea marcatissima, cuore accelerato.

Ore 5. 20. Esame del sangue al microscopio niente d'anormale.

Ore 5. 22. Morte, cuore fermo in diastole, polmoni iperemici, reni, fegato congesti.

C) *Esperienze sulle cavie.*

Esperienza I. — 9 maggio 1904 (sera). Cavia, peso gm. 370.

Ore 3. 50. Iniezione di 1 cmc. di distillato di fiori.

Ore 4. 15. Niente d'anormale.

Ore 4. 20. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.

Ore 4. 25. Stato di topore generale.

10 maggio 1904 (mattino). Esame urine del giorno precedente: alcaline, niente albumina; all'esame chimico traccie dubbie di materie coloranti sanguigne, per altro al microscopio non si riscontrano emazie.

Ore 4. 8. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato di fiori.

Ore 4. 25. Niente d'anormale.

Ore 4. 36. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.

Ore 4. 40. Tremore degli arti posteriori, deambulazione impossibile, conservati la sensibilità dolorifica e i riflessi.

Ore 4. 45. Tremito convulso generale, dispnea, arti posteriori in stato di paresi spastica.

Ore 4. 55. Si rimette alquanto, può camminare, ma lentamente, dopo parecchi passi cade sul fianco; la dispnea continua.

Ore 5. 10. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato. Subito dopo atassia, paresi spastica, scosse muscolari diffuse.

Ore 6. L'animale pare si rimetta, cammina lentamente, ha sempre sussulti nervosi, cade nel camminare or sull'uno or sull'altro fianco, dispnea, aumento del battito cardiaco.

11 maggio 1904 (mattino). Esame urina: alcalina, niente albumina. Allo esame chimico la ricerca delle materie coloranti del sangue, dà risultato negativo.

Ore 4. 20. Iniezione ipodermica di 4 cmc. di distillato di fiori.

Ore 4. 40. L'animale è agitato, tremito generale, paresi spastica arti posteriori, scosse convulsive tonico-cloniche, diffuse anche ai muscoli della masticazione, tanto che durante esse si rompe i denti.

Ore 3. 15. Identico stato, scomparsi i riflessi tranne il palpebrale.

Ore 5. 20. Continuano gli stessi fenomeni, ma più eccentuati.

Ore 5. 30. Si fa un salasso all'animale mentre è in preda a detti sintomi. Esaminato subito il sangue al microscopio, non si riscontra alterazione di sorta, nessuna forma di disfacimento corpuscolare.

12 maggio 1904 (mattino). Esame urina ore 11. 30: alcalina, esame chimico e microscopico negativo.

Ore 5. 20. Iniezione ipodermica di 5 cmc. di distillato di fiori.

Ore 5. 22. Stato di narcosi, paresi spastica degli arti posteriori, dispnea, riflesso palpebrale conservato.

Ore 5. 25. Convulsioni tonico-cloniche, dispnea, battito cardiaco accelerato.

Ore 5. 35. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di estratto.

Ore 5. 37. Accentuazione di tutti i predetti sintomi, abolizione dei riflessi.

Ore 5. 40. Animale in collasso.

13 maggio 1904. Ore 11. 35. L'animale non reagisce a nessuna eccitazione. È moribondo.

Ore 11. 45. Muore. Cuore fermo in diastole, polmoni normali, reni alquanto congesti, nell'urina tolta dalla vescica traccie d'albumina. Esame microscopico negativo.

D) *Esperienze sui conigli.*

Esperienza I. — 14 maggio 1904. Coniglio, peso gm. 1000.

Ore 11. 45. Iniezione endovenosa di 1 cmc. di distillato nella vena femorale destra.

11. 50. Dispnea, sussulti nervosi, scosse tonico-cloniche, battito cardiaco accelerato.

Ore 11. 55. Iniezione di 1 cmc. di estratto nel cavo peritoneale. Fatto in questo momento un preparato di sangue ed osservato al microscopio, si nota che i corpuscoli rossi sono quasi tutti moriformi.

Ore 12. 20. Sussulti e gli stessi ultimi sintomi avuti sulla cavia. Morte, cuore in diastole.

E) *Esperienze sui cani.*

Esperienza I. — 10 maggio 1904. Cane, peso gm. 4000.

Ore 10. 30. Iniezione ipodermica di 10 cmc. di distillato di fiori. Durante tutta la giornata niente d'anormale. In detto giorno si ripete l'iniezione ipodermica di 10 cmc.

Esperienza II. — 10 maggio 1904. Cane, peso gm. 3600.

Ore 11. Iniezione ipodermica di 10 cmc. di distillato di frutto. Come per la prima esperienza, si hanno gli stessi risultati come sopra.

5. Esperienze istituite col distillato di semi freschi per via ipodermica.

A) *Esperienza sulle rane.*

ESPERIENZA I. — 7 maggio 1904. Rana esculenta, peso gr. 24.
Ore 4.35. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 4.47. Niente d'anormale.
Ore 4.55. Idem.
Ore 5.10. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 5.20. Niente d'anormale.
Ore 5.35. Lo stesso.

ESPERIENZA. II. — 8 maggio 1904. Rana esculenta gr. 24.
Ore 10.45. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato.
Ore 11. Niente d'anormale.
Ore 11.5. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 11.20. Niente.
Ore 11.50. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 12.5. Stato di torpore, eccitata reagisce lentamente, fa piccoli salti. Esame del sangue negativo.

ESPERIENZA III. — 8 maggio 1904. Rana esculenta gr. 22.
Ore 5. Iniezione ipodermica di 3 cmc. di distillato.
Ore 5.20. Niente d'anormale.
Ore 5.25. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 5.40. Stato di torpore, eccitata, reagisce, conservati i riflessi palpebrali. All'indomani, le due rane iniettate col distillato di frutto non soffrono alcun disturbo.

B) *Esperienza sui topi.*

ESPERIENZA I. — 8 maggio 1904 (mattino). Topo bianco gr. 24.
Ore 11.30. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 11.35. Niente d'anormale.
Ore 11.40. Iniezione di 1 cmc. di distillato.
Ore 12. Niente d'anormale.

ESPERIENZA II. — 8 maggio 1904 (sera). Topolino bianco gr. 16.
Ore 4.35. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato di frutto.
Ore 4.40. Stato di torpore, eccitato reagisce, conservati i riflessi palpebrali.
Ore 4.55. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato.
Ore 5.10. Stato d'eccitazione con tremiti, dispnea.
Ore 5.15. Niente di anormale.
Ore 5.25. Iniezione di 1 cmc. di distillato.
Ore 5.28. Conservata ancora la sensibilità dolorifica.
Ore 5.40. Torpore, eccitato il riflesso palpebrale reagisce, poca dispnea.
Ore 6.5. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 6.15. Gli stessi disturbi di sopra.
Ore 6.35. Morte. Sangue all'esame microscopico niente d'anormale; cuore in diastole; reni congesti.

6. Esperienze istituite col distillato di bucce di fave per via ipodermica.

C) *Esperienze sulle rane.*

Esperienza I. — 9 maggio 1904. Rana esculenta gr. 17.
Ore 4. 30. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 4. 40. Niente d'anormale.
Ore 5. 10. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 5. 25. Niente d'anormale.

Esperienza II. — 10 maggio 1904. Rana esculenta gr. 24.
Ore 10. 20. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato.
Ore 19. 40. Niente d'anormale.
Ore 10. 45. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato.
Ore 10. 50. Torpore, eccitata, reagisce, conservati i riflessi palpebrali.
Ore 11. 5. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 11. 15. All'eccitazione movimenti tardi, nient'altro d'anormale.

Esperienza III. — 9 maggio 1904. Topolino bianco gr. 16.
Ore 5. 20. Iniezione ipodermica di 3 cmc. di distillato.
Ore 5. 30. Stato di torpore.
Ore 5. 40. Iniezione ipodermica di 2 cmc. di distillato; subito dopo gli stessi sintomi che per il frutto.
Ore 5. 55. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 6. 10. Eccitazione generale, torpore, dispnea, eccitata fa piccoli salti, perdita parziale dei movimenti volontari.
Ore 6. 15. Iniezione ipodermica di 1 cmc. di distillato.
Ore 6. 30. Accentuazione dei predetti sintomi.
Ore 6. 45. Morte. Esame microscopico del sangue niente d'anormale, cuore in diastole; reni alquanto arrossati.

7. Ricerche istituite sull'azione diretta dei distillati di fave sui globuli rossi.

Deposi alcune gocce di sangue normale di topo separate una dall'altra sullo stesso vetrino portoggeti; aggiunsi ad ognuna delle suddette gocce una goccia di distillato di fiori, di frutto e di bucce di fave. Dopo alcuni minuti notai, è vero, qualche cenno ad un'alterazione di forma nei corpuscoli rossi immersi nel distillato di fiori, ma queste ricerche sono insufficienti per poter tirare una conclusione.

Del resto sia che da queste ricerche si fosse ottenuto risultato positivo che negativo non si sarebbe potuto ammettere nè negare con certezza un'azione distruttrice dei distillati in discorso sui globuli rossi.

Se avessi infatti constatata un'azione distruttrice sui globuli rossi si sarebbe benissimo potuto ascriverla al cambiamento del mezzo.

Sappiamo infatti che i globuli rossi si alterano anche soltanto col passare dal plasma di un animale a quello di un altro.

Se avessimo d'altro canto ottenuto risultato negativo non avrei neppure potuto negare un'azione dei distillati di fave sui globuli rossi, inquantochè dalle belle ricerche del Bignami risulta che neppure col chinino si ha in vitro distruzione dei globuli rossi pure appartenenti a sangue di individui affetti da intolleranza chininica.

8. Conclusione.

1. Fra tutti i distillati studiati dal punto di vista farmacologico si dimostra attivo specialmente quello ottenuto dai fiori freschi di fave.

2. Questo distillato possiede un'azione fisio-tossicologica molto energica che ricorda ben da vicino quella della canfora, delle sostanze del suo gruppo e dell'essenze in genere: Cioè mentre nell'animale a sangue freddo predominano i fenomeni depressivi a carico del sistema nervoso, nei mammiferi il distillato di fiori di fave si dimostra energico stimolante del sistema nervoso centrale. Negli stati di grande avvelenamento si nota l'abolizione della sensibilità, dei movimenti riflessi, accompagnata da narcosi.

Meritano speciale menzione i fenomeni d'eccitazione a carico dei centri bulbari. L'attività cardiaca sembra aumentata negli avvelenamenti leggeri.

Il fatto di non aver riprodotto negli animali il quadro completo del favismo non esclude che il profumo dei fiori di fave o l'ingestione dei frutti non possano essere la causa della malattia, e ciò perchè la suscettibilità e la recettività son ben diverse tra uomini ed animali, tra animale e animale. Vi sono infatti parecchi fenomeni che si osservano nell'uomo e non negli animali. Se in uno stesso ambiente contenente profumi, si ponessero degli uomini e degli animali in condizioni identiche di recettività, mentre in alcuni uomini si avrebbe il quadro morboso della intossicazione non si osserverebbe probabilmente nulla negli animali. E mentre nell'uomo il quadro morboso dell'intossicazione ed anche la morte si avverano soltanto col dimorare un certo tempo in un ambiente contenente dei fiori, negli animali questo non si osserva, e per ottenere un quadro morboso simile a quello osservato nell'uomo bisogna far inalare ai medesimi dosi molto più alte di profumi.

XII.

Esperienze sulla tossicità di alcuni profumi.

Riferisco poche esperienze (1) sulla tossicità di alcuni profumi, le quali ci serviranno di confronto con quelle istituite da noi coi distillati di fave.

I. *Jicky* (Guerlain) — 5 maggio 1902; rana; peso grammi 18; temperatura ambiente 20°; inizio dello esperimento ore 9.55. Iniezione nel sacco linfatico sinistro un decimo di cmc. di Jicky. Dopo mezzo minuto, stato d'inquietudine, perdita della forza muscolare. Dopo un minuto, stato paralitico. I riflessi cutanei non risentono l'eccitazione meccanica; il pizzicarne o pungerne la pelle non produce nell'animale reazione alcuna. All'apertura del torace si vede che il cuore continuava a battere. Nervo sciatico destro, eccitazione (distanza dal rocchetto cm. 12) indotta forte, nessuna scossa muscolare. Gli arti anteriori eccitati con la corrente, rispondono con la retrazione dei piedi anteriori. L'eccitazione indotta (distanza cm. 15 dal rocchetto a carro) fatta passare lungo la colonna vertebrale, provoca dei movimenti di reazione alla testa e agli arti anteriori. Alle 10.30 il cuore batte sempre, alle 11.5 batte ancora, ma più debolmente. Alle 12, l'eccitazione indotta non provoca più le contrazioni della testa e degli arti anteriori, bisogna impiegare il rocchetto (distanza cm. 9) per avere una reazione meno viva della precedente, che si propaga agli arti posteriori. La parte di midollo corrispondente al plesso brachiale è particolarmente eccitabile. Alle 12.20 gli stessi fenomeni col rocchetto (distanza cm 6). Il cuore si rimette a battere più forte. Alle 13 il cuore si ferma in diastole; contiene un sangue nero molto venoso.

II. *Jicky* — Rana del peso di grammi 12; temperatura ambiente 20°; 10 maggio 1902; ora 2.15. Si mette la rana sotto una campana contenente un volume d'aria valutata all'incirca un litro, si sospende nell'interno di questa campana del cotone imbevuto in un decimo di cmc. d'essenza di jicky. Dopo 8 minuti l'animale è messo sotto una campana contenente aria pura. La rana ha perduto ogni movimento e quasi tutta la sensibilità. Se la si punge con un ago reagisce appena. Alle 2.30 perdita della mobilità, paralisi, stato indifferente. Alle 2.35 la sensibilità ricompare; pizzicata ritira assai lentamente la zampa. Alle 2.40 ipereccitabilità sotto l'influenza della corrente indotta. Alle 3 la rana ritorna a poco a poco al suo stato normale. Alle 3.30 iniezione di mezzo centigrammo di jicky, dopo 20 minuti il cuore s'arresta in diastole. Lo jicky iniettato sotto la pelle ha dunque presentato nelle nostre esperienze una tossicità considerevole, lassamento che si è manifestata con una risoluzione immediata dell'animale, paresi degli arti con perdita delle reazioni sensibili all'eccitazioni ordinarie. Il cuore ha resistito di più. Lo jicky esercita dunque la sua azione sopratutto sul sistema nervoso. L'esame dell'eccitabilità del nervo sciatico dimostra che

(1) E. Tardif — *Les odeurs et les parfumes* — Paris, Baillière et Fils 1899.

questa influenza l'esercita ugualmente sul sistema nervosoperiferico, che sul centrale.

III. *Violetta Lentheric.* — 25 maggio; rana grammi 18; temperatura ambiente 20°; ore 3.14. Si mette una rana vivacissima in un piatto sotto una campana d'un volume d'aria di circa un litro. Si sospende nell'interno del cotone imbevuto di un decimo di cmc. di violetta. Per impedire lo scambio dell'aria dell'esterno della campana, si è versata dell'acqua sul fondo del piatto, in modo da bagnare completamente la base della campana. La rana respira normalmente. Alle 3.20 non manifesta alcuna sensazione di dolore, eccetto che la respirazione un po' accelerata. Alle 3.25 nessuna modificazione esteriore, manifesta sempre accelerazione della respirazione. Alle 3.30 la rana fa qualche movimento a tempi. Se si batte il turacciolo di bambagia tra le sue narici avviene un fenomeno curioso, benchè il turacciolo non tocchi le sue narici, essa lo ribatte prima con una zampa, poi con l'altra. Questa rana tormentata ed eccitata reagisce molto debolmente, benchè fosse vivacissima. Dal principio alla fine dell'esperienza, ore 3.35, respirazione accelerata. Si vede in questa esperienza che l'essenza di violetta non ha prodotto fenomeni di tossicitá paragonabili a quelli del rosmarino. E ciò si prova con l'esperienza seguente fatta sulla stessa rana.

IV. *Violetta Violet.* — 25 gennaio. Profumo violetta. Alle 3.50 iniezione di un mmc. d'essenza di violetta. L'animale non pare che soffra per questa iniezione; essa reagisce, come prima dell'iniezione, alla puntura causata da un filo di rame. La respirazione è molto più accelerata che durante l'esperienza di semplice assorbimento respiratorio. Nessun' altra particolarità da segnalare. Si vede che in queste due esperienze l'essenza di violetta non ha cagionato fenomeni di tossicità paragonabili a quelli provenienti dal rosmarino.

V. *Corylopsis.* — 17 maggio; rospo grammi 60; temperatura 20°; profumo impiegato: gelsomino. Si usa per questa esperienza lo stesso metodo chè per le esperienze seconda e terza. La dose del profumo usato è di circa un cmc. Ore 5.25. Dopo le prime inspirazioni l'animale sembra ansioso, tormentato, respirazione 150 al minuto. Alle 5.30 l'animale s'agita sotto la campana. Alle 5.40 respirazione 126 al minuto. Alle 5.45 nuova dose di profumo. Il rospo non fa altri movimenti che quelli della respirazione, 80 al minuto. Non reagisce più alle eccitazioni esteriori; ore 6 fine dell'esperienza. Dopo appena un minuto l'animale s'agita lentamente, ciò che dinota se non una cessazione, una diminuzione dell'influenza del profumo. Il gelsomino sembra dunque in questa esperienza dotato di una certa influenza tossica capace di portare notevolmente stupore e difficoltà respiratoria.

VI. *Verbena Guerlain.* — 15 giugno. Rana gr. 45; temperatura 20°; 11 ore del mattino; campana contenente circa due litri d'aria. Si sospende nell'interno un turacciolo imbevuto in alcune goccie di verbena. Respirazione, prima di incominciare l'esperienza, 120. Due minuti dopo l'esperienza, s'ha respirazione a 140. L'animale ha violenti e frequentissimi sussulti; ore 11.4′ respirazioni 200 al minuto; ore 11.20′ iniezione sottocutanea di 1 mmgr. di verbena; 11.22′ l'animale è molto indebolito e non reagisce alla puntura prodotta da un fil di ferro.

VII. *Verbena Guerlain.* — Giugno. Rana peso gr. 26; temperatura 24°;

ore 11.15′ si inietta a questa rana una dose di mezzo mmgr. di verbena; 11.22′ l'animale è inerte muore alcuni minuti dopo.

L'essenza di verbena è come lo jicky un profumo molto penetrante, e d'una grande potenza d'espansione. Si vede come gli effetti sono differenti da quelli prodotti dall'essenza di violetta, come variano anche secondo il peso dell'animale che li subisce.

Concludendo quindi, lo jicky e la verbena, fra questi quattro profumi, sono quelli la cui azione sull'organismo è più attiva; la violetta non ha che una debole azione sugli apparecchi respiratorio e circolatorio; il corylopsis tiene il posto di mezzo.

L'essenza esercita una azione sui centri nervosi e precisamente un'azione sui movimenti respiratorii, come pure una influenza specifica sulla circolazione, e prevalentemente una vaso-costrizione periferica.

XIII.

Casistica relativa all'azione dannosa dei profumi sull'uomo.

Riporterò qui alcuni casi relativi agli effetti prodotti dai profumi sull'uomo, i quali serviranno a chiarire qualche punto riguardante l'etiologia del favismo.

Albicocco. — Una donna aveva comprato al mercato delle albicocche, da cui voleva trarre della conserva. A casa depose questi frutti sul pavimento della sua stanza; la mattina seguente il figlio, ritornando presso sua madre, fu grandemente sorpreso, dopo aver ripetutamente picchiato, di non aver risposta. Temendo una disgrazia, abbatte la porta e trova sua madre che non dava più segni di vita. Un medico chiamato immediatamente fece un abbondante salasso, che richiamò in vita l'ammalata. Si attribuì a ragione questo fatto alle emanazioni che erano state prodotte durante la notte dai frutti.

Arancio. — Sknaigher conobbe una donna, che pur amando gli altri odori, stava male dopo aver respirato quello dei fiori d'arancio.

Un droghiere aveva fatto mettere il contenuto di tre casse d'arancie in un mezzanino. Un giovane di bottega avendo dormito in quello stanzino, rimase quasi asfissiato, e solo per l'aiuto di un medico potè acquistare la conoscenza.

Bettonica. — Valmont de Bamare dice che le parti solubili e odorifere della *bettonica fiorita* sono sì vive, che i giardinieri che le colgono divengono ubriachi e vacillanti come se avessero bevuto del vino.

Cotogno. — I cotogni esalano un odore penetrante che può provocare la asfissia. La signora Z. avendo messo un gran numero di questi frutti nella sua camera da letto, restava quasi asfissiata.

Caprifoglio. — Dice Gmelin che fu veduto l'odore del caprifoglio determinare vomito, debolezza generale e paralisi della lingua.

Elleboro. — Semerto e Boyle hanno veduto degli effetti purgativi dall'odore che spandono l'elleboro nero e la coloquintide quando vengono pestate. L'elleboro bianco ha cagionato vomiti in coloro che lo coglievano.

Garofano. — Sembra che il garofano abbia pure delle esalazioni nocive. Una ragazza di Belfort che s'era addormentata in una stanza dove si era collocato un gran mazzo di garofani, non si svegliò più.

Il signor C. riferisce che un ufficiale provò delle convulsioni e perdette la coscienza, per aver lasciato nella sua camera una certa quantità di fiori di garofano, che egli amava molto. Si fece subito togliere il paniere contenente i fiori, vennero aperte le finestre, e dopo un'ora le convulsioni cessarono e l'infermo riprese l'uso della parola. Da quell'epoca per il lasso di 12 anni, l'ufficiale non poteva sentire l'odore del garofano, senza cadere in deliquio.

Gelsomino. — Nel 1864 il dott. Larient de Barré racconta: « Il 3 settembre 1844 alle 10 di notte, mi coricai in una cameretta dove lasciai dei fiori di gelsomino. Io ebbi un incubo spaventevole, e mi svegliai alle due del mattino tutto in sudore, colpito da una viva cefalea, da dolori alle articolazioni degli arti inferiori, e da un malessere generale. Gettai immediatamente i fiori fuori della camera a cui cambiai l'aria aprendo la porta e la finestra, ma non fui completamente ristabilito che 2 giorni dopo ».

Giglio. — Nel 1779 è stata trovata in Londra una donna morta nel suo letto, senza che si sia potuto sospettare nessuna altra causa di tal maleficio, fuorchè quella data dalle esalazioni d'un gran numero di gigli, che ella teneva nella sua stanza.

Giusquiamo. — Gardin riferisce il caso di persone, che essendosi addormentate in un granaio dove si erano sparse, per uccidere i topi, delle radici di giusquiamo nero, si svegliarono prese da cefalea e da stupore; uno di essi ebbe dei vomiti e una emorragia nasale abbondante.

Bocrasure preparando un unguento, dove entrava la stessa pianta, si sentì preso da una specie d'ebrezza.

Presso un farmacista di Dresda, il fumo dei grani di giusquiamo in combustione produsse una alienazione mentale in due individui, che lo respirarono: in uno di essi il male durò parecchie settimane e ricomparve ancora ad intervalli negli anni seguenti.

Lauro rosa. — Un ufficiale si fece un'alcova con dei rami intrecciati di lauro rosa; chiuse ermeticamente la sua camera e si abbandonò al sonno in quell'alcova; il giorno seguente lo si trovò morto asfissiato. Questa catastrofe fu attribuita alle emanazioni tramandate dal lauro rosa.

Libantius prima ancora aveva fatto conoscere che un individuo era morto per aver lasciato nella sua camera dei fiori di quella pianta.

Lilla. — Un tenore con madre e sorelle asmatiche, padre morto per malattia spinale, diventava nervoso, impressionabile, veniva assalito da gravi disordini per l'odore di quasi tutti i fiori. Nulla d'anormale nella cavità nasale, faringea, laringea; capacità respiratoria 4.100 cmc. Facendolo rimanere un'ora in una camera in cui s'erano messi grandi mazzi di lilla, fu assalito da stanchezza estrema; la sua voce cambiò di timbro; i suoni che emetteva erano meno amplii, la loro tenuta di minor durata, non poteva articolare certe frasi senza riprese respiratorie, la capacità respiratoria scese a 3.300 cmc. (José).

Limone. — Nelle effemeridi dei fatti curiosi della natura, si trovano due osservazioni dello stesso genere: uno di Hanneman sopra un individuo che nella sua giovinezza provava delle coliche quando odorava dei limoni; e sopra uno dei suoi parenti che l'odore delle mele faceva cadere in lipotimia.

Lino. — La signora N... dell'età di 46 anni, di forte costituzione, non può stare in alcun luogo dove si prepari una decozione di seme di lino senza provare pochi istanti appresso, una tumefazione considerevole della faccia, seguìta dalla perdita delle facoltà mentali e da sincope. Ivi sono stato testimonio di questo fatto sorprendente, e lo ho veduto rinnovarsi in questa signora, per l'amministrazione di clisteri preparati col medesimo seme. La tumefazione del viso non si dissipava che dopo 24 ore.

Malva moscata. — Quando le donne sono disposte all'isterismo, le emanazioni della malva moscata determinano gli accessi di questa specie di nevrosi.

Mimosa. — Un baritono di 28 anni perfettamente sano, soffriva di disordini vocali ogni anno in primavera. Per l'odore emanato da un cesto di mimose, ebbe sternutazioni ripetute ed emicrania; più tardi senso di stanchezza e disordini vocali analoghi al caso precedente. L'osservazione rinoscopica dimostrò ipertrofia molle del cornetto medio di destra e qualche granulazione faringea. Guarito perfettamente, si trovò capacità respiratoria cmc. 4.500, ma sottoposto all'azione odorosa protratta di un mazzo di viole, questa scese a 3.500 cmc. Il giorno seguente salì a 4.300 cmc. il terzo giorno tornò al normale. Ebbene, in questo individuo si ebbero gli stessi disordini più o meno attenuati per l'odore della tuberosa, giglio, ed altri fiori; ma non si ebbe alcun disordine per i preparati di *toilette* a base di muschio e di patschiuli.

Muschio. — Ci sono degli odori animali tanto potenti che provocarono degli accidenti gravi. Quando un cacciatore toglie dal daino porta-muschio la borsa, che contiene la preziosa sostanza, ha cura di coprirsi il naso e la bocca con un panno ripiegato più volte, perchè altrimenti prova delle violenti emorragie, causate dalla forza di quest'odore.

Trailles dice che il muschio fa cadere molte donne in deliquio, dà vomiti, vertigini e delle affezioni isteriche.

Il Grazzi sottoponendo un'isterica all'azione prolungata del muschio, ha visto la forza muscolare diminuire progressivamente, poi l'ammalata cadere in un sonno letargico.

Noce - Sambuco. — Boyle dice che allorquando uno si riposa all'ombra del noce o del sambuco addormentandosi, facilmente prova una violenta cefalgia.

Rosa. — Il dott. Burton ha veduto in un ammalato un accesso di febbre raggiungere il parossismo, e il dolore di un attacco di gotta infiammatoria divenire intollerabile per l'azione delle rose e della magnolia, che erano state portate nella camera del malato.

L'odore di rose sebbene grato quasi a tutti, a taluni produce lo starnuto, l'infiammazione degli occhi, deliquî, diarrea; affezioni isteriche nelle donne, e casi di morte e di aborti.

Ledelio parla d'un mercante a cui l'odore delle rose cagionava oftalmia.

Semmerì racconta che due persone, le quali restarono per 5 o 6 ore in una camera dove erano delle rose pallide, ebbero violenti vomiti e diarrea.

Sommaco velenoso. — Il sommaco velenoso è pianta dell'America settentrionale (*Rhus toxicondendron*).

Del veleno di questa pianta non si conosce la costituzione chimica, ma si sa che da essa si sviluppa un principio acre, che esala solo la notte con idrogeno carbonato. Secondo il Fontana, toccando ripetutamente le foglie, o rimanendo a lungo esposti alle loro emanazioni, specialmente di notte, si comincia ad avvertire un arrossamento della cute, un'irritazione per tutta la superficie del corpo, tumefazione, flittene, infine una vera resipela, che dopo il corso regolare, finisce con la desquamazione. Toccando poi ripetutamente le foglie, rimane sulla parte che è venuta a contatto con l'olio acre, una macchia che poi diviene nera all'azione dell'aria, forse per ossidazione. Ingerendo le foglie fresche l'olio volatile si assorbe e dà luogo a prurito cutaneo, a cefalgia, a vertigini e financo a sussulti muscolari.

Violette. — Triller racconta che una giovane, per aver tenuto dei mazzetti di viole per tutte la notte chiusi nella sua camera da letto morì d'apoplessia.

Valeriana. — L'odore di qualsiasi parte di questa pianta produce nei gatti irrequietezza, agitazione poi abbattimento.

Ioal ha riassunto un certo numero di casi, ove diversi accidenti nervosi erano provocati dal profumo dei fiori. Egli ha dimostrato inoltre che l'azione degli odori produce talvolta congestioni nasali, laringee e bronchiali, spasimi e paralisi dei muscoli glottici. In tre casi ha potuto osservare delle emorragie nasali dovute all'influenza degli odori, od ha potuto provocarli a volontà, facendo respirare questi odori sotto i suoi occhi; l'epistassi è preceduta da starnuti e da un rigonfiamento del tessuto erettile della mucosa nasale; gli assegna quindi una origine vaso-motrice; la vasodilatazione della mucosa nasale si produrrebbe molto facilmente presso gli individui sottoposti alla diatesi nevro-artritica. In un caso l'emorragia del naso produceva vero sollievo perchè terminava l'accesso dello starnuto, di rinorrea, e di lacrimazione cagionate dalle sostanze odorose.

L'epistassi ha potuto essere evitata per la polverizzazione locale di una soluzione di cocaina.

Contemporaneamente a queste osservazioni, Chardên e Tuvernier, riportano fatti eguali. Infine Cloquet, ed altri, hanno visto svilupparsi l'orticaria sotto l'influenza degli odori, specialmente quello del seme di lino; Ioal ha pubblicato tre osservazioni in cui l'orticaria ed i fenomeni dispneici erano prodotti, sia dall'essenza di menta, d'angelica, d'anice stellato, di melissa, sia dall'iodoformio, sia dalla rosa, dal lilla, dal giacinto.

Si trattava nei tre casi di gente a temperamento nervoso e di stipite nevro-artritiche; nel primo caso ha potuto riprodurre sperimentalmente l'eruzione cutanea facendo respirare diverse essenze aromatiche.

Fatti analoghi sono stati osservati dal Bethé, dal Selmotzles: essi dimostrarono che sotto l'influenza d'una eccitazione olfattiva, i fenomeni vasomotori possono mostrarsi tanto bene dalla parte della pelle, quanto dalla mucosa nasale e bronchiale.

I fiori, le cui emanazioni sono nocevoli, sono dotati principalmente, dice Cloquet, d'un odore soave come nauseante; tali sono il giglio, il narciso, le tuberose, la violetta, la rosa, il sambuco. Mentre qnelli che danno un odore aromatico, come la salvia, il rosmarino, ecc., sembrano atti a rianimare l'energia vitale.

Per ingestione si ebbero disturbi dai seguenti vegetali.

Vainiglia. — Questa produce il vanillismo, che può essere contratto o dagli operai che la manipolano, o per avere usato la vainiglia come condimento. Si citano casi di avvelenamento prodotti da gelati e da crema alla vainiglia, che sembrano attacchi di colica. Negli operai il lavorare la vainiglia produce sul viso e sulle mani un'eruzione di forma papulosa o pustolosa; ma a questa possono inoltre seguire sintomi nervosi, come vertigini, cefalea, prostrazione.

Piselli, fave, veccie. — Gli steli dei piselli, fave, veccie, secondo Jansen, determinano uno stato analogo alla lupinosi.

Carciofo. — Il prof. Farthe descrive casi di intossicazione grave in seguito ad ingestione di carciofi cotti; essi determinano dolori di stomaco, diarrea, crampi. Gli avvelenamenti sono più gravi e più frequenti se i carciofi mangiati sono colti da qualche giorno. I carciofi venefici tendono a diventare verdastri, dopo la cottura, nella parte esterna.

Spongiole. — Nel trattato di Cantani e Maragliano leggesi una comunicazione dell'Albertoni, sugli effetti dannosi provocati dalle spongiole.

« Esse, così egli scrive, differiscono dai funghi tanto dal lato botanico che tossicologico. Le spongiole appartengono al genere Helvella e *morchelle* dell'ordine dei discomiceti. Velenose, quando ingerite a fresco, perdono la loro tossicità a secco o lavate abbondantemente con acqua calda. Il principio attivo non è muscarina; ma Böhm e Kultz isolarono un acido che chiamarono *Elvellico*, accanto a cui si trova colina; quest'acido sarebbe il principio tossico. Produce itterizia, emoglobinuria, albuminuria, morte per coma ».

Latirus e Lupinus. — Il profumo dei fiori del *Latyrus alatus*, del *lupinus luteus*, *albus*, *angustifolius*, pare (1) non eserciti azione alcuna, mentre i semi producono un'affezione che ricorda perfettamente la paralisi spastica. Così pure il *Latyrus clymenum* e il *melictos officinalis* secondo il Zago.

XIV.

Studio comparativo tra la sintomatologia che si osserva nel favismo e quella che caratterizza le intossicazioni prodotte dalla inalazione o dalla ingestione di sostanze vegetali volatili e fisse.

Per illuminare la etiologia del favismo ritenni non senza importanza il ricercare se esistessero altre sostanze vegetali volatili e fisse che fossero capaci di produrre un quadro morboso simile a quello della malattia in discorso. E ciò per vedere se fosse possi-

(1) Per altro nella *Revue d'Hygiène*, 1879, pag. 606, A. Blaise riferisce quanto segue:
« La graine est si pernicieuse certaines années, disent les indigènes, qu'il suffit de coucher une nuite sur la paille de djilben pour se réveiller paralysé ».

bile collocare il favismo tra le numerose forme d'intossicazione prodotte sia dalle emanazioni sia dall'ingestione di sostanze di speciali vegetali.

A questo scopo compilai un quadro sinottico comparato nel quale raccolsi la sintomatologia del favismo e quella delle varie intossicazioni suaccennate.

Da questo quadro trassi il seguente elenco contenente quelle sostanze che col favismo hanno comune anche soltanto qualche sintomo principale, come itterizia, ematuria, emoglobinuria:

1. *Ginestra.* — Itterizia, cefalgia, vertigini, sonnolenza, sussurro alle orecchie, tremito, polso debole, febbre, prostrazione, vomito, sete, lingua patinosa, diarrea, nefrite, albuminuria, ematuria.

2. *Spongiole.* — Itterizia, cefalgia, vertigini, coma, respiro accelerato, alterazione dei globuli rossi, dolori all'epigastrio, vomito, sete, diarrea, nefrite, albuminuria, sedimento di cilindri.

3. *Pinus pinaster.* — Coma, polso debole, vomito, sete, diarrea, albuminaria, ematuria, polso frequente.

4. *Dafne mezereum.* — Respiro accelerato, polso frequente, vomito, sete, diarrea, nefrite, albuminuria, ematuria.

5. *Lauro rosa.* — Cefalgia, vertigini, sonnolenza, polso debole, vomito, diarrea, ematuria.

6. *Copaifera officinalis.* — Tremito, febbre, vomito, diarrea, albuminuria, ematuria, ritenzione d'urina.

7. *Aconito napello.* — Itterizia, vertigini, prostrazione, polso debole, vomito, ipersecrezione di bile.

8. *Brassica rapa.* Vertigini, sussurro alle orecchie, respiro accelerato, polso debole, diarrea, ematuria.

9. *Ciclamen europeum.* — Cefalgia, vertigini, vomito, diarrea, emoglobinuria.

10. *Cinnamomum cassia.* — Itterizia, albuminuria, ematuria, emoglobinuria.

11. *Coloquintide cucumis.* — Polso debole, dolori all'epigastrio, vomito, ipertrofia del fegato, ritenzione d'urina.

12. *Chenopodium ibridum.* — Itterizia, vertigini, milza ingrandita, albuminuria, ematuria.

13. *Lupino.* — Itterizia, febbre, diarrea, albuminuria, nefrite.

14. *Aristolochia clematite.* — Polso frequente, vomito, diarrea, ematuria.

15. *Pitecolobium samam.* — Itterizia, diminuzione dei globuli rossi, albuminuria, emoglobinuria.

16. *Anemone pulsatella.* — Respiro accelerato, vomito, diarrea, ematuria.

17. *Mercuriale perennis.* — Sonnolenza, coma, vomito, diarrea, ematuria.

18. *Iuniperus communis.* — Respiro accelerato, diarrea, ematuria, nefrite.

19. *Asaro.* — Cefalgia, diarrea, ematuria.

Non poche quindi sono le sostanze che inalate od ingerite producono un quadro morboso molto simile al favismo. Primeggiano tra queste le seguenti, ordinate secondo la maggiore importanza dei sintomi:

1. *Spongiole.* — Itterizia, coma, alterazione dei globuli rossi, vomito, albuminuria, cilindri renali.

2. *Ginestra.* — Itterizia, febbre, vomito, albuminuria ed ematuria.

3. *Copaifera officinalis.* — Febbre, vomito, albuminuria, ematuria, ritenzione d'urina.

4. *Cinnamomum cassia.* — Itterizia, albuminuria, ematuria, emoglobinuria, nefrite.

5. *Chenopodium ibridum.* — Itterizia, albuminuria, ematuria.

6. *Pinus pinaster.* — Coma, vomito, albuminuria, ematuria.

7. *Dafne mezereum.* — Vomito, albuminuria, ematuria, nefrite.

8. *Lauro rosa.* — Vomito, ematuria.

9. *Aconito napello.* — Itterizia, vomito, ipersecrezione di bile.

10. *Ciclamen europeum.* — Vomito, emoglobinuria.

11. *Coloquintide cucumis.* — Vomito, ingrossamento del fegato, ritenzione d'urina.

XV.

Etiologia.

Ora soltanto che ho trattato nei limiti del possibile le varie quistioni riguardanti il favismo, studiando tutti gli argomenti preliminari che devevano illuminarci sulla natura di questa misteriosa affezione, mi è permesso di svolgere l'ultimo e più importante capitolo, quello dell'etiologia.

Le ipotesi che si possono fare relativamente all'etiologia del favismo sono ben poche. Noi le discuteremo brevemente principiando da quelle che hanno meno possibilità di essere nel vero.

Ipotesi I. — Può il favismo essere prodotto da un microrganismo sconosciuto sì da dover classificare il medesimo tra le ma-

lattie infettive e collocarlo precisamente tra quelle forme di ittero endemico o epidemico conosciute?

Parlano contro la natura infettiva del favismo i seguenti fatti:

1. Il favismo non si osserva che nella breve stagione della fioritura e della maturazione delle fave, mentre le varie forme di ittero si avverano anche in altri mesi dell'anno.

2. La diffusione del favismo è limitata esclusivamente alle località ove si coltivano e si consumano fave in gran quantità, mentre le endemie e le epidemie di ittero furono descritte ovunque.

3. La mancanza poi sopratutto di un periodo d'incubazione parla contro alla natura infettiva della malattia in discorso.

La febbre soltanto che qualche volta si osserva nel favismo potrebbe parlare in favore, senonchè, come abbiamo visto, si ha pure febbre in ben accertate intossicazioni simili, quali sono quelle prodotte dall'inalazione del gigliò, dell'iris germanica, dell'ipomene mancinella, del latyrus cicera, del ginestro, del lupino, ecc.

Ipotesi II. — Pure ammesso il nesso causale indiscutibile tra fave e favismo, non potrebbe questa malattia essere prodotta da germi, che come si sospetta avvenire per la pellagra, si trovino sulle fave?

A questa seconda ipotesi ho già risposto discutendo la prima.

Mi limiterò soltanto ad aggiungere a quanto ho detto sopra, che si ha favismo anche per ingestione di fave verdi cotte e quindi sterilizzate e non guaste come credesi avvenga pel granturco nell'etiologia della pellagra nonchè per inalazione del profumo della pianta a distanza.

Ipotesi III. — Può il favismo come nella febbre del fieno essere prodotta dalla inalazione del polline dei fiori di fava?

Basta ricordare che casi di favismo si hanno anche dopo che la fioritura delle fave è terminata; che si hanno numerosi casi in individui che non hanno mai avvicinato campi di fave in fiore e che contrassero il favismo soltanto colla ingestione dei semi verdi cotti, per dimostrare l'insussistenza di questa ipotesi. Data poi la struttura dei fiori delle fave come delle papilionacee in genere la diffusione del polline a distanza non può essere che molto difficile. Infatti la disposizione degli stami e dello stigma in queste piante esclude l'autogamia. Il polline è vischioso. Le labiade sono zooidiofile e non già anemofile.

Ipotesi IV. — Viene il favismo prodotto dall'emanazione del profumo delle fave e dall'ingestione dei frutti verdi, crudi o cotti?

Questa è l'ipotesi che riteniamo ormai dimostrata. Riepilogheremo brevemente i numerosi fatti raccolti in proposito nel nostro studio:

1. Tutte le storie cliniche riportate ci mostrano chiaro come l'inalazione del profumo dei fiori di fave o l'ingestione dei frutti siano l'unica causa della malattia.

2. Pure in favore di una relazione tra fave e favismo parla il fatto che i primi sintomi si hanno subito o dopo brevissimo tempo dall'inalazione del profumo dei fiori o dall'ingestione dei semi.

3. Anche il senso di nausea, provocato dall'odore dei fiori di fave e dall'ingestione dei semi negl' individui predisposti al favismo, avvalora sempre più il nesso che esiste tra fave e favismo.

4. Riguardo alla professione, sono colpiti prevalentemente i contadini che si occupano nella coltivazione delle fave.

5. La diffusione del favismo sta in rapporto colla maggior o minor coltivazione delle fave o col maggiore o minor consumo delle medesime.

6. L'epoca esclusiva del favismo che è data dall'aprile, maggio e giugno coincide completamente con quella della fioritura e della maturazione delle fave.

7. Anche la durata della malattia, che si protrae soltanto di pochi giorni, viene sempre in sostegno della teoria tossica.

8. La terapia stessa del favismo, costituita prevalentemente da eccitanti, da tonici e da purganti parla pure nello stesso senso. Allo stesso trattamento infatti si assoggettano gli individui affetti da altre intossicazioni simili.

9. Nelle località ove domina il favismo tanto i medici che il volgo, non hanno alcun dubbio sull'intimo nesso esistente tra favismo e fave.

10. Dalle esperienze istituite sull'uomo risulta pure che gli individui predisposti al favismo vanno soggetti a disturbi per inalazione del profumo di fiori di fave e dell'estratto dei medesimi.

11. Infine il particolareggiato studio comparativo tra la sintomatologia del favismo e quella che si osserva nell' intossicazione delle più note sostanze volatili vegetali o per ingestione di frutti o parti di speciali piante permette di collocare il favismo tra le summenzionate intossicazioni vegetali come ad esempio le seguenti (che hanno comuni col favismo, i principali sintomi: emoglobinuria, ematuria, itterizia, febbre).

Spongiole, ginestra, copaifera officinalis, cinnamoumm cassia, chenopodium ibridum, pinus pinaster, dafne mezereum.

Qual'è il principio attivo contenuto nelle fave e che determina il favismo?

Siccome si ha presso a poco lo stesso quadro sintomatologico tanto per ingestione quanto per inalazione, e siccome la tossicità va scomparendo col disseccamento delle fave e susseguente cottura, così la maggior probabilità cade, come si disse, sopra ad una sostanza volatile e precisamente ad un'essenza.

Del resto nelle diverse specie di fave non si sono trovate che le seguenti sostanze organiche fisse: vicina, convicina, colina, luteina gannidina (nei germogli).

Contro l'ipotetica relazione del favismo colla malaria, ricorderò che l'epoca della maggior morbidità per favismo coincide coll'epoca della minor morbidità per malaria. Che la malaria poi possa predisporre all'intossicazione fabica come talora predispone alla chininica resta a provarsi.

XVII.

Profilassi.

La profilassi del favismo, come quella della grande maggioranza delle intossicazioni causate da inalazioni di sostanze volatili (gas deleteri, essenze, ecc.), o da ingestione di bevande o cibi tossici (come nell'alcoolismo, negli avvelenamenti da funghi o da carni guaste) consiste nell'evitare l'introduzione nell'organismo dell'agente venefico.

Nel caso nostro poi essendo necessaria una certa predisposizione individuale per ammalare, basterà agli individui predisposti consigliare di astenersi dal mangiare fave fresche crude o cotte e di fuggire il profumo di questa pianta.

Pubblicazioni consultate.

Oltre la bibliografia del favismo riportata al principio del lavoro ho consultato anche le pubblicazioni seguenti:

Zodiacus medico Gallicus Phisicorum Gallicorum. Genova, 1682.

LAURENTII BELLINI. *De urinos et pulsibus, de missiones sanguinos, de febbris de morbis capitis et pictoris*. Francoforte e Lipsia, 1698.

HIPPOCRATIS. *Aphorismi*. Napoli, 1681.

JOAN JACOBO WECKERO. *Antidotorum generale e speciale*. Basilea.
LUNERY. *Dizionario sulle droghe*. Venezia, 1737.
NICOLÒ CIRILLO. *Consulti medici*. Napoli, 1738.
LAURENTII HEISTERI. *Compendium medicinae praticae*. Venezia, 1763.
LORENZO CASIELLO. *Lessico farmaceutico chimico*. Venezia, 1792.
ARCANGELO D'ONOFICA. *Lezioni di medicina pratica*. Napoli, 1819.
PUCINOTTI. *Storia della Medicina*.
SCARSIGNANI. Palermo, 1857.
CASANOVA. *Les plantes veneneuses*
VIRCHOW u. HIRT. *Jahresbericht von Pharmakologie*.
HUSEMANN u. SCILGER. *Pflanzenstoffe*, 1ª edizione.
HUSEMANN. *Artzneimiltellehre und Toxicologie*.
DRAGENDORFF. *Sulle sostanze chimiche contenute nelle piante*.
INDEX. *Catalogue americano*.
CHIRONE. *Trattato critico dei medicamenti nuovi*. Napoli. Anno 1900, pag. 487.
HENZI. *Les plantes leguminières*. Paris, 1898.
Italia Agricola di Piacenza. 1900, n. 3.
Il Coltivatore. Casalmonferrato. 1888, n. 22.
Id. Id. 1895, » 29.
Annales Agronomiques. Fasc. XXVI, n. 12, 25 dicembre 1900.
W. von KNICRIEM. *Les munces des seves dans l'alimentation, etc.*
Riassunti dall'originale Landwirschaftliche. Jarbuch. 1900, vol. XXIX, fasc. 3, pag. 524.
ROZIER. *Cours complet d'agricolture ou Dictionnaire universel d'agricolture*. Tome IV, pag. 559 (voce *sive*).

BIBLIOGRAFIA DEI PROFUMI.

PICHS. *De gustus et olfactus*. Paris, 1829.
CLOQUET. Traité des odeurs et des sens de l'olfactions. Paris, 1821.
SCHIF. *Influence de l'éxitation olfactive sur la temperature du cerveau*. Paris, 1821.
DUMÉRY. *Des odeurs de leurs nature et de leur action phisiologique*. Paris, 1843.
ROBYQUET. *Sur les aromes*. 1820.
PIESSE. *Des parfumes et des odeurs*. 1864.
TYNDALL. *Absorbtion de la chaleur par les odeurs*. Paris, 1871.
REUJONS. Odori e profumi.
LÉWIN. *Traité de tossicologie*. Traduction par POUCHET. Parigi, 1903.

Istituto d'Igiene della R. Università di Napoli

Esperienze d'immunizzazione reciproca fra alcune specie di streptotricee

per il dott. **ENRICO CALENDOLI**, assistente.

Le conoscenze, acquisite negli ultimi tempi sulle streptotricee, hanno dimostrato che esse costituiscono un gruppo molto importante di microrganismi, essendo assai diffuse nell'ambiente e comprendendo parecchie specie patogene. Le streptotricee, perciò, appaiono sempre più degne dell'interesse degli studiosi.

Di ricerche sperimentali sull'immunizzazione verso questi microrganismi sono a mia conoscenza solo quelle del Di Donna, che in questo Istituto d'igiene ha studiato e descritto una *streptothrix* patogena, isolata dal prof. De Giaxa da uno sputo (1). È anche per consiglio del prof. De Giaxa che io ho cercato di stabilire se i conigli, immunizzati verso una data specie di streptotricee, posseggano alcun grado di immunità verso una specie differente.

Per le esperienze mi sono servito di due specie di streptotricee patogene, delle quali si avevano i campioni nell'Istituto. Di esse, una è quella isolata dal prof. De Giaxa e descritta dal Di Donna, e per brevità l'indicherò con A; l'altra è stata isolata, anche da uno sputo, dal dott. Di Donna, che la descriverà in un lavoro di prossima pubblicazione. I caratteri morfologici, culturali e biologici dimostrano che quest'ultima, che indicherò con B, è una specie patogena di streptotricea, differente dalla prima.

Nello stesso tempo, poichè studi recenti condurrebbero a fare ammettere l'identità della natura e del meccanismo di azione dei componenti albumi-

(1) Questi Annali, vol. XIV, 1904.

noidei dei batteri patogeni e dei non patogeni (1), per vedere se fosse possibile conferire con streptotricee non patogene l'immunità verso specie patogene, ho trattato alcuni conigli con due varietà di *streptothrix alba*, delle quali una, che indicherò con **a**, era stata da me isolata dal vaccino; l'altra si trovava nella collezione dell'Istituto ed era stata isolata da residui polverosi di grano: la indicherò con **b**. Per assicurarmi che queste ultime streptotricee non erano patogene per i conigli, ho inoculato 5 cmc. di cultura bene sviluppata in brodo, previo scuotimento (sapendo che le relative culture formano un deposito al fondo, lasciando il brodo del tutto limpido), sia nelle cavità pleuriche, sia nelle vene marginali delle orecchie, a diversi conigli, i quali non hanno nulla sofferto in seguito alle inoculazioni.

Per mantenere alta la virulenza delle streptotricee A e B ho dovuto passarle continuamente per i conigli, i quali venivano inoculati nella cavità pleurica destra, d'ordinario ogni settimana o in tempo più breve quando lo credevo necessario. L'innesto delle nuove culture veniva sempre fatto dall'essudato pleurico. La virulenza di queste due streptotricee era molto differente, in quanto potei calcolare la DML della streptotricea A a 1/500 di centimetro cubo di cultura in brodo, mentre quella della streptotricea B risultava di 1/4 di centimetro cubo. Poichè la loro virulenza si abbassava facilmente ed in breve tempo con l'invecchiarsi delle culture, oltre i continui passaggi attraverso gli animali, non trascurai per ciascuna esperienza di controllare la DML. Per conferire l'immunità ai conigli ho inoculato dosi progressivamente crescenti di culture in brodo, adoperando in primo tempo culture sterilizzate per un'ora a 60° C, o culture vecchie di più mesi. Praticavo le inoculazioni nella cavità pleurica destra; nei conigli immunizzati poi l'inoculazione con la streptotricea patogena differente, era fatta nella pleura sinistra.

Perdetti al principio degli esperimenti alcuni conigli; il che mi fece in seguito molto cauto nel fare trascorrere fra l'una inoculazione e l'altra un tempo più lungo di quello che occorreva perchè gli animali ritornassero al peso primitivo, quando questo si abbassava in seguito all'inoculazione, benchè non sempre la morte fosse susseguita alla diminuzione del peso. Credo utile riassumere nei seguenti quadri i dati più importanti dei diari di tali conigli, morti prima che avessi potuto conferire loro il grado di immunità prefissomi.

---

(1) Enea D. *Azione della nucleina da batteri patogeni e non patogeni sul potere battericida del siero di sangue normale.* La Riforma Medica, anno XIX, n. 47.

Conigli trattati con la streptotricea A.

EPOCA	Peso 1°	Peso 2°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 1° 2°	
9 novem. 1903	1620	1670	0.25	
15 » »	1820	1895	0.33	
21 » »	1700	1780	0.33	
30 » »	1840	1995	0.5	Cultura sterile
7 dicem. »	1840	1940	0.66	
15 » »	1840	1905	1.0	
21 » »	1845	1845	1.5	
28 » »	2155	2080	2.0	
2 genn. 1904	2180	1970	0.12	
3 » »	2300	..		
4 » »	morto	..		
11 » »	...	2040	0.18	
25 » »	..	2060	0.25	
17 febb. »	..	2025	0.25	
23 » »	..	1845		
24 » »	..	morto		

Coniglio 1°, trattato con la streptotricea B.

EPOCA	Peso	Quantità di cultura inoculata in cmc.	
31 ottobre 1903 . .	1650	0.25	
26 novem. » . .	1655	0.33	
3 dicem. » . .	1700	0.5	
8 » » . .	1625	0.66	Cultura sterile
14 » » . .	1795	1.0	
21 » » . .	1625	1.5	
28 » » . .	1790	2.0	
2 gennaio 1904 . .	1760	0.12	
11 » » . .	2040	0.18	
22 » » . .	2270	0.25	
24 » » . .	2365	0.5	
25 » » . .	morto		

Coniglio 2°, trattato con la streptotricea B.

EPOCA	Peso	Quantità di cultura inoculata in cmc.	
31 ottobre 1903 . .	1475	0.25	
6 novem. » . .	1400	..	Cultura sterile
7 » » . .	morto	..	

Coniglio 3°,
trattato con la streptotricea **B.**

EPOCA	Peso	Quantità di cultura inoculata in cmc.	
15 novem. 1903 . .	1510	0.25	Cultura sterile
8 dicem. » . .	1380	0.5	
15 » » . .	1475	1.0	
21 » » . .	1425	1.5	
28 » » . .	1595	2.0	
2 gennaio 1904 . .	1610	0.12	
11 » » . .	1810	0.18	
22 » » . .	1930	0.25	
1 febbraio » . .	1900		
2 » » . .	morto		

Coniglio 4°,
trattato con la streptotricea **B.**

EPOCA	Peso	Quantità di cultura inoculata in cmc.	
7 gennaio 1904 . .	1825	0.5	Cultura sterile
15 » » . .	1880	0.1	
16 » » . .	morto		

Coniglio 5°,
trattato con la streptotricea **B.**

EPOCA	Peso	Quantità di cultura inoculata in cmc.	
14 febbraio 1904 . .	1475	1.0	Cultura sterile
28 » » . .	1800	1.5	
18 marzo » . .	1890	2.0	
19 » » . .	morto		

Coniglio 6°,
trattato con la streptotricea **B.**

EPOCA	Peso	Quantità di cultura inoculata in cmc.	
16 marzo 1904 . .	1260	1.5	Cultura sterile
20 » » . .	1265	2.0	
31 » » . .	1280	0.1	
25 aprile » . .	1470	0.2	
9 maggio » . .	1525	0.35	
21 » » . .	1590	0.5	
3 giugno » . .	1585	0.75	
15 » » . .	1590	1.0	
4 luglio » . .	1650	1.25	
18 » » . .	1645	1.5	
4 agosto » . .	1680	2.0	
27 » » . .	1700	2.0	
4 ottobre » . .	1750	2.5	
2 novem. » . .	1840	3.0	
4 » » . .	morto		

Ecco ora le tabelle, che riassumono il diario dei conigli, ai quali ho potuto conferire il grado di immunità prefissami. In esse è indicato anche il successivo trattamento con la streptotricea patogena differente ed il risultato relativamente alla sopravvivenza od alla morte degli animali.

Conigli immunizzati con la streptotricea A.

EPOCA	Peso			Quantità di cultura inoculata in cmc.		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
7 gennaio 1904 . .	..	1265	1140	..	0.5	Cultura sterile
15 » » . .	..	1485	1165	..	1.0	
25 » » . .	..	1525	1095	..	1.0	
14 febbraio » . .	..	1695	1190	..	1.5	
28 » » . .	..	1650	1350	..	2.0	
4 marzo » . .	1110	..	..	0.5		Cultura sterile
13 » » . .	..	1810	1405		0.1	
31 » » . .	1450	1730	1480	1.5	0.25	
24 aprile » . .	1460	1845	1460	0.05	0.5	
11 maggio » . .	..	1810	1475		0.75	
12 » » . .	1335	..	..	0.25		
27 » » . .	1465	2020	1560	0.5	1.0	
14 giugno » . .	1595	2040	1460	0.75	1.25	
4 luglio » . .	1650	1890	1360	1.0	1.5	
18 » » . .	1700	2000	1470	1.5	1.75	
5 agosto » . .	1800	1980	1305		2.0	
5 settembre » . .	1640	1925	1325		2.5	
11 ottobre » . .	1800	2085	1400		3.0	
7 novembre » . .	1890	2090	1420		3.0	
16 » » . .	1720 sopravvive	..	..	2DML str. *B*		
20 » » . .	..	2060 sopravvive	1485 sopravvive	..	4DML di strep. *B*	

Altri 3 conigli (4°, 5° e 6°), immunizzati con la streptotricea A, ebbero un trattamento più lungo, in quanto per un certo tempo furono ripetutamente trattati con la dose massima stabilita, come si può vedere dal seguente riassunto dei diarii.

Conigli 4° e 5°. Pesi originari 1370 e 1950. La prima inoculazione ha luogo il 20 agosto 1903. Nel primo mese, con leggera perdita del peso primitivo, ricevono dosi crescenti di cultura sterile fino a cmc. 2; quindi dosi crescenti di cultura virulenta, con la distanza da 10 a 15 giorni, fino a cmc. 2, e, con la distanza di circa un mese, fino a cmc. 3. Il peso negli ultimi tempi sale progressivamente.

Coniglio 6°. Peso originario 1540. Prima inoculazione il 20 agosto 1903. Con intervallo di 5 a 15 giorni riceve da cmc. 1 a 2.5 di cultura vecchia di 3 mesi; quindi, con lo stesso intervallo, da cmc. 0.5 a 1.5 di cultura vecchia di un mese. Segue, come per i due precedenti, l'iniezione di cultura virulenta da cmc. 0.1 a 3.0.

Successivamente questi tre conigli furono inoculati secondo risulta dal seguente quadro:

EPOCA	Peso			Quantità di cultura inoculata in cmc.		
	4°	5°	6°	4°	5°	6°
30 aprile 1904 . .	1845	2160	1870		3	
18 maggio » . .	2005	2500	1800		3	
9 giugno » . .	2130	2430	2230		3	
4 luglio » . .	1900	2460	2030		3	
5 agosto » . .	1875	2375	1880		3	
7 settembre » . .	1780	2730	2010		3	
17 ottobre » . .	1810	2510	1990		3	
7 novembre » . .	1800	2430	1950		3	
14 » » . .	1730 sopravvive	..	..	2DML str. *B*	3	
24 » » . .	..	2420	2000 salassato		6DML str. *B*	
28 » » . .	..	2235 sopravvive	..			

Conigli immunizzati con la streptotricea B.

EPOCA	Peso 1°	Peso 2°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 1°	2°
27 genn. 1904	2060	2000	0.5	
8 febb. »	2280	1840	1.0	
14 » »	..	2035		1.0 Cultura sterile
28 » »	2380	2230	1.5	
17 marzo »	2305	2145	2.0	
31 » »	2070	2280	0.1	
25 aprile »	2255	2220	0.2	
9 maggio »	2260	2340	0.35	
21 » »	2495	2625	0.5	
3 giugno »	2535	2365	0.75	
15 » »	2440	2370	1.0	
4 luglio »	2380	2500	1.25	
18 » »	2430	2485	1 5	
4 agosto »	2410	2570	2.0	
27 » »	2600	2650	2 0	
4 ottobre »	2450	2560	2.5	
27 » »	..	2580		3
31 » »	..	..		3DML str. *A*
2 novem. »	2410	morto	3	
9 » »	..	..	2DML str. *A*	
11 » »	morto	..		

Conigli trattati con la streptotricea a.

EPOCA	Peso 1°	Peso 2°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 1°	2°
21 nov. 1903	1330	1310	2.0	
28 » »	1680	1535	3.0 Cultura sterile	
3 dicem. »	1615	1590	3.0	
8 » »	1525	1530	0.25	
14 » »	1703	1735	0.5	
19 » »	1710	1790	1.0	
24 » »	1790	1795	1.5	
29 » »	1870	1790	2.0	
7 genn. 1904	2050	1760	2.25	
22 » »	2145	1890	2.5	
8 febb. »	2260	1770	3.0	
7 marzo »	2450	1865	3.5	
31 » »	2410	2090	4.0	
25 aprile »	2400	2040	4.5	
17 maggio »	2500	2090	5 0	
7 giugno »	2500	2250	5 0	
11 » »	..	..	2DML str. *A*	
13 » »	morto	..		
4 luglio »	..	2180		5.0
5 agosto »	..	2230		5.0
7 settem. »	..	2140		5.0
12 ottobre »	..	2300		5.0
7 novem. »	..	2370		5.0
16 » »	..	2380 soprav-vive		2DML str. *B*

Conigli trattati con la streptotricea b.

EPOCA	Peso 1°	Peso 2°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 1°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 2°	EPOCA	Peso 1°	Peso 2°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 1°	Quantità di cultura inoculata in cmc. 2°
24 ottob. 1903	1800	1530	1		7 marzo 1904	2180	1710	3.5	
27 » »	1890	1550	2		31 » »	1980	1720	4.0	
2 novem. »	1670	1525		3	26 aprile »	1890	1615	4.5	
20 » »	1890	1520	3	Cultura sterile	17 maggio »	2040	1805	5.0	
2 dicem. »	1800	1490	0.25		7 giugno »	1945	1750	5.0	
7 » »	1820	1530	0.5	3	11 » »	...	..	2DML str. *A*	5.0
14 » »	1900	1565	0.66	0.33	13 » »	morto	..		
19 » »	1925	1545	1.0		4 luglio »	..	1700		5.0
24 » »	1900	1590	1.5		5 agosto »	..	1795		5.0
29 » »	1940	1650	2.0		7 settem. »	..	1740		5.0
7 genn. 1904	1890	1675	2.5		12 ottobre »	..	1850		5.0
22 » »	2020	1800	2.5		7 novem. »	..	1875		5.0
7 febb. »	1995	1700	3.0		16 » »	..	sopravvive		2DML str. *B*

Ho fatto sempre l'autopsia dei conigli morti, ed ho trovato le note anatomo-patologiche proprie delle streptotricee relative. L'esame del sangue mi ha fatto in tutti i casi riscontrare la presenza della streptotricea, che doveva presumere avere causato la morte, mentre non ho mai rinvenuto quella, verso la quale i conigli erano immunizzati. Ho tenuto in osservazione, almeno per un altro mese dall'ultimo trattamento, i conigli sopravvissuti.

Ho saggiato il potere agglutinante del siero del sangue di tutti

i conigli immunizzati, estraendo questo dalle vene marginali delle orecchie, ed ho costantemente trovato che, mentre il siero nel rapporto 1 : 200 dava in breve tempo una forte agglutinazione con culture fresche in brodo della stessa streptotricea, con la quale erano stati immunizzati i relativi conigli, non ne dava alcuna nel rapporto 1 : 50 con l'altra streptotricea patogena. Non ho potuto procedere a prove di agglutinazione con le culture di streptotricee non patogene, perchè non sono riuscito ad ottenere, per quanto le agitassi assai di frequente e le facessi crescere lentamente a temperatura poco adatta al loro sviluppo, l'intorbidamento del brodo. Il siero di sangue dei conigli, trattati con le streptotricee non patogene, non agglutinava (1 : 50) le culture delle patogene.

Salassai il coniglio 6°, immunizzato con la streptotricea A, per fare un tentativo di sieroterapia verso una streptotricea poco virulenta, col siero di un coniglio fortemente immunizzato con una streptotricea molto virulenta. I tentativi di sieroterapia verso la stessa streptotricea, che era servita ad immunizzare gli animali, dai quali si ricavava il siero, erano già riusciti negativi al Di Donna (1). Anche la mia esperienza ebbe esito negativo, in quanto un coniglio di gm. 1570, inoculato contemporaneamente con cmc. 4 di siero nella vena marginale e con 2 DML di streptotricea B nella cavità pleurica, morì il giorno dopo.

Credo di potere riassumere nel seguente modo i principali risultati delle mie esperienze:

1. *È possibile immunizzare fortemente i conigli con streptotricee patogene.*

2. *I conigli, immunizzati verso una specie di streptotricea molto virulenta, presentano un certo grado d'immunità verso un'altra specie patogena meno virulenta. Il caso inverso non si verifica.*

3. *I conigli trattati con ripetute inoculazioni di streptotricee non patogene (str. alba), presentano un certo grado di immunità verso una specie patogena poco virulenta e non ne presentano alcuno verso una specie molto virulenta.*

4. *Il siero di sangue dei conigli, immunizzati con una specie di streptotricea, agglutina la stessa streptotricea e non un'altra di specie differente.*

---

(1) Loc. cit.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Contributo allo studio dei veleni del b. coli commune

per il Dott. **MARIO LEVI DELLA VIDA**, Assistente.

Le infezioni che riconoscono come fattori etiologici il *b. typhi*, il *b. dysentericum* e il *b. coli commune* presentano tali sindromi morbose da far pensare all'azione di sostanze tossiche specifiche. Ed è perciò che patologi e batteriologi hanno rivolto la loro attività a ricercare, nelle colture di quei microrganismi, i veleni ai quali si potessero imputare la reazione generale e le affezioni tossiche secondarie.

Alcuni, prendendo per esempio quanto si verifica per il batterio difterico e per il bacillo del tetano, hanno studiato le proprietà dei filtrati delle brodocolture; altri hanno indagato gli effetti della iniezione di sostanze tossiche ottenute con vari trattamenti dai corpi batterici.

Così, per citare soltanto i principali studi, abbiamo avuto per il b. del tifo la tossina di Sanarelli (21) e quella di Chantemesse (10), per il disenterico quella di Celli e Scala (7) e Celli e Valenti (8), per il *b. coli* i veleni ottenuti da Buchner (5), Gilbert (12), Roger (19), Cesaris-Demel e Orlandi (9), Celli e Scala (7).

Soltanto oggi però, dopo i molti studi fatti sui veleni batterici, siamo in grado di orizzontarci fra i risultati, molte volte contraddittori, di tante ricerche.

Si è dato con molta facilità il nome di *tossina* a qualunque sostanza tossica ottenuta da colture di microrganismi patogeni. Ora questo nome va riservato ai veleni di un numero limitato di germi, veleni che nei loro caratteri, nel loro modo di produzione, nella azione sugli animali, presentano una somma di tali proprietà da individualizzare quel gruppo di sostanze tossiche al quale apparten-

gono il veleno del b. della difterite, del tetano, del carbonchio sintomatico (Schattenfroh e Grassberger). Accanto a questa prima serie di veleni abbiamo quei prodotti venefici provenienti dal disfacimento dei corpi batterici, specifici anch'essi del microrganismo che li ha prodotti, ma che per molte proprietà devono essere tenuti disgiunti dalle vere tossine: e questi sono stati detti *endotossine*. Inoltre tutti i germi, patogeni e non patogeni, contengono nel loro protoplasma un veleno, non specifico, ad azione cumulativa, chiamato ora *nucleina*, ora *proteina*, e la cui presenza, in condizioni speciali, si può rendere manifesta, sia con i germi che danno vere tossine, sia con quelli che agiscono mercè endotossine (*).

Era necessario che brevemente esponessi questi concetti (16, 26) affinchè ci si possa rendere ragione del nuovo orientamento che hanno preso gli studi per ricercare nelle colture dei microrganismi quei veleni, ai quali si deve da una parte l'azione tossica, dall'altra lo stabilirsi dell'immunità acquisita.

La ricerca di una endotossina è stata alacremente proseguita negli ultimi due anni per il b. del tifo. Provocando una autolisi dei corpi batterici [Brieger (2), Schütze (22), Conradi (11), Brieger e Mayer (34)], o triturando i germi a bassissime temperature [Macfadyan e Rowland (13-15), Bassenge e Mayer (1)], gli sperimentatori hanno ottenuto volta a volta delle sostanze ora molto, ora poco tossiche, ma tutte capaci di indurre nell'organismo degli animali trattati una specifica reazione, con la produzione di anticorpi. D'altra parte però alcuni ammettono ancora che questi veleni poca azione esplichino nella infezione tifosa [Bassenge e Mayer (1)] e dai semplici filtrati di brodoculture dicono di aver ottenuto veleni che considerano come tossine solubili del b. del tifo [Rodet, Lagriffoul e Wathy (18), M. e M.me Werner (25)].

Per quanto riguarda il b. dissenterico, oltre ai primi lavori di Celli e Scala (7) e di Celli e Valenti (8), i quali avevano chiamato il veleno del dissenterico *tossiproteina*, conosciamo quelli recentissimi del Conradi (11), del Todd (23) e del Rosenthal (20); questi due ultimi autori parlano di una vera tossina del b. dissenterico.

Per il *b. coli* le ricerche negli ultimi anni sono state meno numerose; e citerò soltanto quelle di Vaughan (24), che avrebbe ottenuto una tossina intracellulare, e quelle del Carega (6), che analo-

(*) Secondo Wolff (26) le proteine non sarebbero altro che endotossine alterate per tal modo dai trattamenti subiti, che hanno perduto alcune delle loro proprietà.

gamente a quanto ha fatto il Paladino-Blandini (17) per il b. di Eberth, ha isolato dai filtrati delle brodocolture di *b. coli* una nucleoalbumina e una nucleina.

Con grande probabilità le differenze fra i risultati dei vari autori sono dovute a differenze di grado.

Nelle brodocolture dei b. del tetano e della difterite un certo numero di batteri è sicuramente destinato a morire, e nel liquido si trovano perciò i costituenti del loro corpo cellulare. Che tali costituenti esistano ed abbiano un'azione tossica lo prova quel fenomeno che va sotto il nome di paradosso di Behring; ma che essi rappresentino la parte minima dei veleni che si trovano nei filtrati delle brodocolture, è dimostrato dal fatto che nella immunizzazione comune degli animali sieroproduttori non si ottiene un siero batteriolitico. Così pure nelle brodocolture di altri germi per i quali non si può dimostrare la presenza di una tossina solubile, questa forse esisterà, ma in così piccola quantità da non essere rilevabile con gli esperimenti.

Per avere una risposta intorno all'esistenza ed alla natura dei veleni del *b. coli commune* mi parve conveniente non già di ricorrere a complicati mezzi di estrazione, ma di studiare quanto si ottiene filtrando le brodocolture, e, a seconda delle proprietà dei filtrati, ascrivere questi all'una o all'altra categoria di veleni.

Questo è quanto mi sono accinto a fare.

Scelta dello stipite di b. coli.

Era necessario anzitutto che io avessi uno stipite di *b. coli* fornito di forte potere tossico, e quindi ho preso in esame vari *b. coli* di diversa provenienza.

Sapendosi da vari studi che nella infezione tifosa i *b. coli* dello intestino sono fortemente esaltati, sperimentai dapprima su due stipiti di *b. coli* isolati dalle feci di individui malati di tifo addominale.

Ho quindi isolato un *b. coli* dalle feci di un cavallo e dagli escrementi di una vacca; è nota infatti l'alta virulenza e la tossicità del b. del colon di parecchi animali erbivori.

Finalmente ho saggiato un *b. coli* isolato dalle feci di un bambino malato di enterocolite.

Fra tutti questi stipiti quello che più degli altri si dimostrò virulento fu l'ultimo, quello cioè isolato dalle feci del bambino; e con

questo io avevo incominciato le mie esperienze, allorchè dal professore Livio Vincenzi fu mandato in questo Istituto un batterio isolato a Sassari dalle evacuazioni di un individuo malato di enterite dissenteriforme, e che per le sue proprietà morfologiche, colturali e biologiche fu riconosciuto essere il *b. coli commune*.

Questo germe è dotato di un forte potere virulento, e tale si mantiene per lungo tempo, coltivandolo nei terreni artificiali di coltura; proprietà questa di grande valore per i miei scopi. Di esso mi sono perciò servito in tutte le ulteriori ricerche.

Scelta del terreno di coltura.

Base di tutti i terreni è stato l'infuso di carne di cavallo o di vacca, con l'aggiunta di alcune di quelle sostanze che comunemente si usano nell'allestimento delle colture dei microrganismi.

Ho preparato in fiaschetti 250 cmc. di:

infuso di carne di cavallo, con l'aggiunta dell'1 % di peptone Witte e del 0.50 % di Na Cl;

infuso di carne di vacca, con l'aggiunta dell'1 % di peptone Witte e del 0.50 % di Na Cl;

infuso di carne di cavallo, con l'aggiunta del 2 % di glucosio, dell'1 % di peptone Witte, del 0.50 % di Na Cl;

infuso di carne di cavallo, con l'aggiunta del 2 % di glucosio, dell'1 % di lattosio, dell'1 % di peptone Witte, del 0.50 % di Na Cl;

infuso di carne di vacca, con l'aggiunta del 2 % di glucosio, dell'1 % di lattosio, dell'1 % di peptone Witte, del 0.50 % di Na Cl.

Le differenze della tossicità dei filtrati non sono molto notevoli per le brodocolture fatte in questi diversi terreni. Però, a parità di condizioni, l'aggiunta degli idrati di carbonio agisce favorevolmente sulla tossicità del materiale.

Se si coltiva il *b. coli* in brodo ordinario e in brodo lattosato e glucosato, e quindi si inoculano le brodocolture in due cavie, non vi è differenza nella dose minima letale fra il materiale proveniente dai due terreni di coltura. In questo caso la morte dell'animale è dovuta alla infezione più che alla intossicazione, e il *b. coli* seminato in brodo lattosato e glucosato non diviene più virulento. Parimenti, se si fanno in serie parecchi passaggi del *b. coli* in terreni zuccherati, si può dimostrare che la virulenza del microrganismo non è affatto aumentata. Invece i filtrati di una brodocoltura

comune e di una coltura in brodo zuccherato dello stesso *b. coli* agiscono un po' diversamente, in quanto che quello proveniente dalla seconda esplica la sua azione più prontamente e in minor dose che quello proveniente dalla prima. Nelle colture con l'aggiunta di idrati di carbonio il *b. coli* è quindi capace di liberare in maggior copia sostanze tossiche.

Scuotimento, età della coltura.

Influenza dell'ossigeno.

Le colture sono state tenute in termostato alla temperatura di 37° C. Alcune furono lasciate a sè, altre sottoposte ad uno scuotimento per 10-20 minuti, una o due volte al giorno.

Ho sperimentato su colture sviluppatesi in presenza dell'ossigeno atmosferico, e su altre nelle quali avevo praticato un'aspirazione fino ad una pressione negativa di 440 mm. Hg., per avvicinarmi alle condizioni di relativa anaerobiosi che si verificano nel tubo gastro-enterico.

Ho eseguito la filtrazione di colture di 5, di 10-14, di 22 e di 30 giorni.

Dalle ricerche comparative fatte con filtrati di brodocoltura cui avevo sottoposto a queste varie condizioni, è risultato:

che lo scuotimento ha una certa azione favorevole sulla tossicità dei filtrati di brodocolture comuni; non ha quasi affatto importanza invece per le brodocolture in terreni zuccherati;

che la condizione di aereobiosi è più favorevole che quella di anaereobiosi a dare filtrati tossici;

che una grande importanza ha l'età della brodocoltura: i risultati migliori si ottengono col filtrato di brodocolture tenute a 37° C. per 10-14 giorni; la tossicità va crescendo nelle colture fino al 10° giorno, e dopo il 14° a poco a poco va diminuendo.

Trattamenti delle brodocolture dopo lo sviluppo.

Ho trattato a volte le brodocolture, prima di procedere alla filtrazione, con mezzi chimici e fisici capaci di aumentare la autolisi dei batteri.

Ho saggiato sul *b. coli* soluzioni di Na Cl di varia concentrazione, e per mezzo di preparati microscopici comparativi ho determinato essere la soluzione al 4 $^{0}/_{0}$ quella che esercitava sui germi

la massima azione batteriolitica. Ho aggiunto perciò alle brodocolture già sviluppate, in parti uguali, una soluzione Na Cl all'8 °/₀ e ho tenuto tale miscela a 37° C. per 24 h, dopo di che procedevo alla filtrazione.

D'altra parte prima di filtrare ho sottoposto alcune brodocolture all'azione del calore, mantenendole ad una temperatura di 56° C. per 12 h.

Nè in tal caso, nè col mezzo su descritto ho potuto avere un filtrato che fosse più tossico di quello proveniente da brodocolture in terreni zuccherati.

In questi avviene bensì una autolisi, e lo si può dimostrare paragonando un preparato a fresco o colorato di una brodocoltura comune e di una brodocoltura in terreni contenenti idrati di carbonio: ma è questa una lieve batteriolisi, che si stabilisce gradatamente durante lo sviluppo dei germi.

Filtrazione. — Animali da esperimento.

Mi sono servito delle candele di porcellana che vanno sotto il nome di filtri Silberschmidt, o dei filtri Reichel-Maassen, promuovendo la filtrazione mercè l'aspirazione ottenuta con la pompa a caduta d'acqua, ad una pressione negativa di 540-660 mm. Hg.

Il filtrato, dopo che mi ero convinto della sua sterilità, s'inoculava in conigli, gatti e cavie, sotto cute, nel peritoneo e nelle vene.

Il migliore reattivo biologico per dimostrare e valutare l'azione tossica dei filtrati fu la cavia (del peso di 200-250 gr.), e la via prescelta d'inoculazione fu quella sottocutanea.

Proprietà dei filtrati di brodocolture del b. coli.

La inoculazione sottocutanea nella cavia è seguita costantemente da una sindrome morbosa che si manifesta brevissimo tempo dopo la iniezione.

L'animale si fa triste, apatico, non risponde più vivamente agli stimoli, perde del tutto l'appetito; spesso presenta grave dispnea; in tale stato si può mantenere per uno o due giorni, poi, a seconda della dose del materiale inoculato, l'animale a poco a poco si ristabilisce, oppure viene a morte.

In questo caso alla autopsia si riscontrano delle alterazioni anatomiche sempre costanti, nel punto di inoculazione e negli organi.

Si nota una vasta infiltrazione, edematoso-emorragica proprio in corrispondenza del punto dove fu praticata l'iniezione, diffluente, gelatinosa tutto all'intorno per una vasta zona. Le ghiandole linfatiche, specialmente le prossimiori, sono notevolmente iperemiche ed infiltrate. Nella cavità peritoneale vi è una quantità più o meno notevole di liquido limpido, ora citrino chiaro, ora rossastro: parimenti si nota versamento nelle pleure. Il peritoneo parietale ed il viscerale appaiono iniettati. L'intestino tenue è congesto; non vi sono lesioni nella mucosa.

I reni, il fegato sono congesti; la milza, non aumentata di volume, è vivamente iperemica e spesso presenta infarti emorragici. Le capsule surrenali sono rigonfie, iperemiche, e vi si scorgono spesso emorragie nella zona più interna della sostanza corticale. Frequentemente si ha grave congestione polmonare. Iperemia si nota nelle meningi e nella sostanza cerebrale.

Queste lesioni da una parte ricordano quelle dovute alle inoculazioni di vere tossine (versamenti nelle cavità, lesioni delle capsule surrenali); dall'altra sono eguali a quelle che conseguono alla iniezione di corpi batterici (alterazioni locali).

La morte è più o meno rapida, le lesioni più o meno gravi, a seconda della dose del filtrato iniettata; talora questa proporzionalità è veramente notevole. Riporto dal protocollo di laboratorio la storia di alcune cavie, che valga come esempio.

Cavia 12. Inoculazione sotto cute di 6 cmc. del filtrato sterile di una coltura in brodo glucosato di *b. coli.* Morta dopo 4 ore. Presenta vasta infiltrazione emorragica del sottocutaneo nel punto di inoculazione, gelatinosa all'intorno. Scarso liquido nel cavo peritoneale. Congestione di tutti gli organi.

Cavia 13. Inoculazione come sopra di 4 cmc. Morta dopo 6 ore. Infiltraziane emorragica e gelatinosa del sottocutaneo. Discreta quantità di liquido nella cavità addominale. Congestione di tutti gli organi, emorragie nella milza e nelle capsule surrenali.

Cavia 14. Inoculazione come sopra di 2 cmc. Morta dopo 10 ore. Reperto anatomico come la precedente.

Cavia 15. Inoculazione come sopra di 2 cmc. Morta dopo 12 ore. Reperto anatomico come la precedente.

Cavia 16. Inoculazione come sopra di 0.75 cmc. Morta dopo 40 ore. Reperto anatomico come la precedente.

Cavia 17. Inoculazione come sopra di 0.50 cmc. Dopo aver presentato nel primo giorno sintomi di abbattimento e anoressia completa, si ristabilisce.

Non sempre però ho ottenuto dei filtrati che a dosi così piccole fossero letali. Con brodocolture della stessa composizione, tenute in

termostato per un egual numero di giorni, ho avuto a volte dei filtrati che uccidevano le cavie nella quantità di 1 cmc., mentre altre volte la dose minima letale era di 4-5 cmc., senza che io potessi scoprire alcuna causa di questa differenza.

La dose minima letale per la cavia di 200-250 gr. nei filtrati freschi ha oscillato sempre fra 0. 75 cmc. e 5 cmc.

Le inoculazioni di piccole dosi di veleno, inferiori alla dose minima letale, ripetute parecchie volte, determinano negli animali trattati un notevole dimagrimento.

Riporto il peso di 5 conigli, in 3 dei quali ho praticato a giorni alterni, per la durata di 15 giorni, inoculazioni di 3 cmc. del filtrato di brodocoltura del *b. coli* (D. M. L. per la cavia 5 cmc.).

ANIMALI	Peso iniziale	Dopo 10 giorni		Dopo tre settimane	
		peso	differenza	peso	differenza
Coniglio 4	gr. 1075	960	— 115	920	— 155
Coniglio 5	gr. 1115	930	— 185	930	— 185
Coniglio 6	gr. 1120	980	— 140	890	— 230
Coniglio 7 (controllo) . . .	gr. 1025	990	— 35	1100	+ 75
Coniglio 8 (controllo) . . .	gr. 1055	1090	+ 35	1000	— 55

Il veleno contenuto nei filtrati delle brodocolture perde molto della sua tossicità col tempo, anche se mantenuto ad una bassa temperatura e riparato dalla luce, e malgrado l'aggiunta di acido fenico, di toluolo, di timolo. Quello stesso filtrato che uccideva le cavie nella quantità di 0. 75 cmc. due giorni dopo la filtrazione, inoculato dopo 8 giorni non uccideva più se non nella dose di 5 cmc., e dopo 15 giorni nella dose di 7 cmc.

Per contro il veleno contenuto nel filtrato è molto resistente alle alte temperature; ecco riassunti in una tabella i dati desunti dalla inoculazione del filtrato sottoposto alla azione di alte temperature.

Numero d'ordine	Trattamento del filtrato		Esito della inoculazione	Lesioni anatomiche
	Temperatura	Durata		
Cavia 24	..	..	† dopo 12 ore	Lesioni locali notevoli; versamento nelle cavità; iperemia dei vari organi; congestione polmonare; emorragie nella milza e capsule surrenali.
» 25	+ 56° C	1 ora	† » 16 »	Come la precedente.
» 26	+ 68° C	1 ora	† » 16 »	Lesioni locali come la precedente; non versamento nelle cavità; congestione di tutti gli organi; emorragie nelle capsule surrenali.
» 27	+ 100° C	15′	† » 20 »	Lesioni locali meno estese; le altre lesioni come nel caso precedente.
» 28	idem	30′	† » 24 »	Come la precedente.
» 29	idem	1 ora	† » 16 »	Lesioni locali limitate; congestione di tutti gli organi.
» 30	idem	idem	† » 24 »	Come la precedente.
» 31	idem	2 ore	sopravvive	Infiltrazione in corrispondenza del punto di iniezione, dolentissima; scompare nel 3° giorno.
» 32	idem	3 ore	idem	Infiltrazione locale meno notevole della precedente; la palpazione sembra riuscire meno dolorosa; va diminuendo e scompare nel 3° giorno.

Trattando il filtrato con alcool si ottiene un precipitato abbondante, che raccolto su carta da filtro e disciolto in acqua distillata si dimostrò pochissimo tossico. Bisogna quindi inferirne che le sostanze che si trovano nel filtrato o siano state alterate per il trattamento con l'alcool, o non siano state precipitate se non in parte.

Veleni secondari.

Ho ricercato se nei filtrati fossero contenuti dei veleni secondari, e ho fermato principalmente la mia attenzione sul potere piogeno e sul potere emolitico.

In quanto al primo, le lesioni che si riscontrano negli animali inoculati per sè sole bastano a negarlo. Malgrado la infiltrazione notevole non vi è mai traccia di suppurazione, e, variando la dose

mutando il punto di iniezione per ricercare un luogo favorevole per le condizioni anatomiche del sottocutaneo, non mi è mai riuscito di ottenere la formazione di un ascesso.

In quanto ad una emolisina le prove istituite con emazie di cavia e di coniglio mi permettono di rispondere che, per lo meno verso il sangue di questi due animali, il filtrato delle brodocolture del *b. coli* non ha alcuna azione emolitica.

Immunizzazione.

Inoculando a cavie dosi di filtrato inferiori alla dose minima letale, si determina nel siero di quelle la produzione di anticorpi.

Con le prove *in vitro*, mescolando il siero di cavia trattata con un'ansa normale di agarcoltura del *b. coli*, e riportando al volume di un centimetro cubo con soluzione al 0.85 % di Na Cl, si può dimostrare che il siero possiede proprietà agglutinanti e battericide; non in altissimo grado, ma ben manifeste qualora si faccia il confronto con le proprietà del siero di cavia normale.

Invece, mescolando la dose letale del filtrato insieme con il siero di cavia trattata ed inoculando la miscela ad una cavia normale, non solo non si salva questa da morte, ma nè si ottiene alcun ritardo nella morte, nè le alterazioni anatomiche sono meno gravi di quelle che si hanno per l'inoculazione del filtrato puro; il siero non ha dimostrato adunque di avere alcun potere antitossico.

Natura del veleno.

Se noi raggruppiamo tutte le proprietà che mano a mano abbiamo studiato nei filtrati delle brodocolture di *b. coli*, veniamo a raccogliere una somma di criteri per ascrivere il veleno ottenuto al gruppo delle endotossine.

La tossicità massima nei filtrati di colture vecchie di 10-14 giorni e via via digradante con l'invecchiamento della coltura, la maggior produzione di veleni quando con lo scuotimento si agevoli il disfacimento dei batteri o quando con l'aggiunta di zuccheri nel brodo si favorisca la autolisi dei microrganismi, parlano in favore della ipotesi che i veleni che si diffondono nel liquido provengano dallo stesso corpo batterico.

I filtrati si dimostrano tossici, ma non in dosi piccole come il filtrato di una coltura del bacillo del tetano, della difterite, del car-

bonchio sintomatico; ora la azione notevole esplicata da dosi minime è un carattere che possiedono solo le tossine secrete.

Alla inoculazione non segue un periodo di incubazione durante il quale l'animale mostri di non risentirsi affatto del materiale iniettato; ma i fenomeni di intossicamento compaiono quasi subito dopo la inoculazione stessa.

Gli animali trattati con il filtrato di *b. coli reagiscono dando luogo alla formazione non di anticorpi antitossici, ma soltanto di anticorpi agglutinanti e batteriolitici.*

Tutti questi caratteri, ai quali si deve anche aggiungere la notevolissima resistenza alle alte temperature, furono dimostrati propri delle endotossine, o veleni estratti, e sono appunto i criteri che le differenziano dalle tossine propriamente dette, o veleni secreti.

Conclusioni.

1. Nel filtrato delle brodocolture di *b. coli commune*, specialmente se al terreno di coltura sono stati aggiunti degli idrati di carbonio, è dimostrabile la presenza di un veleno.

2. Questo veleno negli animali trattati produce una sindrome morbosa e lesioni anatomiche di varia intensità, ma notevoli sempre per la loro costanza; determina inoltre la formazione di anticorpi specifici agglutinanti e battericidi, non di antitossine.

3. Il veleno suddetto ha le proprietà caratteristiche delle endotossine.

BIBLIOGRAFIA.

1. BASSENGE und MAYER. *Zur Toxingewinnung aus gefrorenen Typhusbacillen.* Ctbl. für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, I Abt. Orig. Bd. XXXVI, 1904, p. 332.
2. BRIEGER. *Ueber die Darstellung einer spezifisch wirkenden Substanz aus Typhusbakterien.* Deutsche medicinische Wochenschrift, 1901, p. 477.
3. BRIEGER und MAYER. *Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer Substanzen aus Bakterien.* Ibid., 1903, p. 309.
4. BRIEGER und MAYER. *Zur Gewinnung spezifischer Substanzen aus Typhusbacillen.* Ibid., 1904, p. 980.
5. BUCHNER. *Ueber eiterungerregende Stoffe in der Bakterienzellen.* Ctbl. f. Bakt., ecc., Bd. VIII, 1890, p. 321.
6. CAREGA. *Ueber die aktiven Substanzen des b. coli.* Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abt., Orig., Bd. XXXIV, 1903, p. 323.

7. CELLI. *Eziologia della dissenteria nei suoi rapporti col b. coli e colle sue tossine.* Questi Annali, 1896, pag. 203.
8. CELLI und VALENTI. *Nochmals über die Aetiologie der Dysenterie.* Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abt., Bd. XXV, 1899, p. 481.
9. CESARIS-DEMEL e ORLANDI. Arch. per le scienze mediche, vol. XVII, 1893.
10. CHANTEMESSE. Le progrès médical, avril 1898; riferito nella Deutsche med. Wochenschrift, 1898, therapeutische Beilage, p. 71.
11. CONRADI. *Ueber lösliche durch aseptische Autolyse erhaltene Giftstoffe von Ruhr- und Thyphusbacillen.* Deutsche med. Woch., 1903, p. 26.
12. GILBERT. La Semaine médicale, 1893.
13. MACFADYAN und ROWLAND. *Upon the intracellular constituens of the typhoid bacillus.* Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abt., Orig., Bd. XXXIV, 1903, p. 618.
14. MACFADYAN und ROWLAND. *Ueber die intracellulären Toxinen gewisser Mikrorganismen.* Vorläufige Mitteilung. Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abt., Orig., Bd. XXXV, p. 415.
15. MACFADYAN. *Ueber das Vorkommen und den Nachweis von intracellulären Toxinen.* Biochemisches Ctbl., Bd. II, 1904, p. 330.
16. OPPENHEIMER. *Toxine und Antitoxine.* Jena, G. Fischer, 1904.
17. PALADINO-BLANDINI. *Ricerca sulle sostanze attive delle tifocolture.* La Riforma medica, 1901, vol. II e III; 1902, vol. I.
18. RODET, LAGRIFFOUL et WATHY. *La toxine soluble du bacille d'Eberth.* Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abt., Orig., Bd. XXXVI, 1904, p. 935.
19. ROGER. Le Semaine médicale, 1893.
20. ROSENTHAL. *Das Dysenterietoxin (auf natürlichem Wege gewonnen).* Deutsche med. Woch., 1904, p. 235.
21. SANARELLI. *Etudes sur la fièvre typhoïde expérimentale.* Annales de l'Institut Pasteur, 1894, p. 193.
22. SCHÜTZE. *Ueber die spezifische Wirkung einer aus Tiphusbakterien gewonnen Substanz im thierischen Organismus.* Deutsche med. Woch., 1902, p. 478.
23. TODD. *On a dysentery antitoxin.* British medical Journal, 1903, p. 1456; riferito nel Bulletin de l'Institut Pasteur, 1904, p. 131.
24. VAUGHAN. *The intracellular Toxin of some of the pathogenic Bacteria.* Journal of American med. Association, 1903, p. 898, riferito nel Biochemisches Ctbl., Bd. I, 1903, p. 487.
25. WERNER, M.r et M.me. C. R. de la Société de Biologie de Paris, 1904, p. 882.
26. WOLFF. *Ueber Grundgesetze der Immunität.* Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abt., Orig., Bd. XXXVII, 1904, p. 390, 566, 684.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Intorno alla presenza di sostanze antiagglutinanti nei sieri normali

per il dott. **DANTE DE BLASI**, aiuto.

È già da lungo tempo nota la possibilità di provocare sperimentalmente nel siero di sangue degli animali la comparsa di sostanze capaci di scemare o sopprimere l'azione specifica di vari anticorpi: antiambocettori ed anticomplementi che inibiscono l'emolisi o la batteriolisi, antiemagglutinine, ecc. È altresì noto che l'inibizione può avvenire anche per la presenza di speciali modificazioni degli anticorpi stessi, le quali, pur avendo perduto il potere di produrre il fenomeno caratteristico che producono gli anticorpi inalterati (precipitazione, agglutinazione, emolisi, batteriolisi, ecc.), conservano tuttavia la proprietà di fissare i rispettivi antigeni: così gli ambocettoroidi (Neisser e Doering, Wechsberg), i precipitoidi (Kraus, Kraus e v. Pirquet, Eisenberg, Pick, Müller ed altri), gli agglutinoidi (Eisenberg e Volk, Wassermann, Bail, De Blasi e De Berardinis ed altri) producono singolari fenomeni d'inibizione rispettivamente sull'emolisi e sulla batteriolisi, sulla precipitazione, sull'agglutinazione specifiche; similmente agiscono i complementoidi (Ehrlich, Wassermann ed altri), che hanno bensì perduto la proprietà di promuovere i fenomeni citolitici in genere, ma conservano il potere di fissarsi agli ambocettori.

Dagli studi di molti autori risulta che queste modificazioni inattive si ottengono artificialmente trattando i sieri specifici con varie sostanze chimiche; si rinvengono nei sieri specifici conservati per

lungo tempo; ma si possono qualche volta dimostrare anche in sieri specifici freschi. Le modificazioni inattive degli anticorpi non hanno soltanto un'importanza teorica, ma talora anche pratica. A questo proposito il Paltauf (1), ricordando il fenomeno paradosso dell'agglutinazione, manifesta in concentrazioni deboli e mancante in concentrazioni forti a causa della presenza di proagglutinoidi, accenna al valore pratico che il fatto può avere per la sierodiagnosi ed agli errori che talvolta possono derivare dalla trascuranza di esso, e soggiunge: « . . . es erscheint gar nicht unwahrscheinlich dass in manchen Fällen von Typhus, wo das Serum 1 : 10 keine oder eine unvollständige Reaktion gab, solche Irrtümer vorgefallen sind ». Ora mi sia permesso di rammentare che *tale possibilità era già stata da me dimostrata* nell'autunno del 1902 in due casi di tifo, nei quali il siero fu esaminato verso la metà del secondo settenario: nel primo caso l'agglutinazione, netta dopo 2 ore nei rapporti 1 : 25 e 1 : 50, era appena percettibile nel rapporto 1 : 10; nel secondo caso fu osservata l'agglutinazione netta dopo 2 ore nei rapporti 1 : 50 e 1 : 80, appena percettibile nel rapporto 1 : 25, mancante nel rapporto 1 : 10 (2). E circa un anno dopo il Cerrito (3), esaminando il potere agglutinante del siero di sangue di 15 tifosi, s'imbattè in due esemplari, che offrivano lo stesso fenomeno. Anzi in uno dei due sieri (45ª giornata di malattia) l'agglutinazione dopo 2 ore mancava perfino nei rapporti 1 : 50 e 1 : 100, mentre nei rapporti 1 : 250 e 1 : 500 era completa già dopo un'ora; soltanto dopo 6 ore il fenomeno si dimostrò appena percettibile anche nei primi due rapporti. Sicchè le osservazioni del fenomeno paradosso presentato da sieri di tifosi, pubblicate recentissimamente dallo Scheller (4), non sono che una conferma di quelle che io feci nel 1902 e pubblicai nel 1903.

Ora le sostanze inibitrici, siano trasformazioni degli anticorpi stessi ovvero sostanze ben differenti da esse, non si rinvengono soltanto nei sieri specifici, ma possono anche essere ottenute, benchè in piccola quantità, nei sieri normali. Così, per quanto concerne l'inibizione dovuta alle modificazioni degli anticorpi stessi, lo

---

(1) *Die Agglutination*, p. 739: in Kolle u. Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.

(2) De Blasi e De Berardinis. *Ricerche sulle agglutinine del tifo.* Questi Annali, vol. XIII, n. s., 1903, pag. 600.

(3) *Intorno alla tecnica della sierodiagnosi del tifo.* Questi Annali, vol. XIV, n. s., 1904, pag. 411.

(4) *Experimentelle Beiträge zur Theorie und Praxis der Gruber-Widalschen Agglutinationsprobe* (Centralblatt f. Bakt., I Abt. Orig., XXXVIII B., 1905, p. 100 e seg.: 25 genn. 1905).

Scheller (1) ha di recente provato con numerose esperienze che la formazione di agglutinoidi, più precisamente di proagglutinoidi, si può provocare nel siero normale di cavallo, che contiene una buona quantità di tifoagglutinine.

Sostanze inibitrici, diverse dalle trasformazioni inattive degli anticorpi, sono state dimostrate da parecchi autori nei sieri normali: antiemolisine, sostanze che inibiscono l'azione delle antitossine, delle precipitine, delle batteriolisine. Rammento, a titolo di esempio, che Landsteiner e Halban, Michaelis, Schur ed altri osservarono che l'azione di un siero precipitante specifico può essere inibita coll'aggiunta di un siero di sangue normale eterologo. La presenza di sostanze antibatteriolitiche nei sieri normali è stata recentissimamente dimostrata da Pfeiffer e Friedberger (2).

Ch'io sappia, osservazioni simili di sostanze antagonistiche aventi azione sulle agglutinine, non sono state per anco pubblicate, e perciò riferisco brevemente intorno ad alcune mie esperienze concernenti questo argomento.

Studiando l'influenza reciproca che due sieri, l'uno di coniglio e l'altro di cavia, entrambi immunizzati con b. del tifo, esercitano sulla loro azione agglutinante, mi occorse di osservare che, quando adoperavo rapporti convenienti, non ottenevo una sommazione di effetti, come era da aspettarsi, ma un vero e proprio fenomeno di interferenza. Prima di presentare le tabelle che dimostrano questo fatto, fo un cenno intorno alla tecnica seguita.

Ho sempre adoperato colture su agar di b. del tifo, di 20-24 ore, emulsionate in soluzione di NaCl al 0.85 °/$_0$. Per eseguire le reazioni nei vari rapporti ho preparato successive diluzioni di ciascuno dei due sieri nella stessa soluzione fisiologica e poi le ho mescolate in convenienti proporzioni: cmc. 0.10 delle diluzioni di ciascun siero o delle miscele dei due sieri contenevano le volute quantità rispettivamente di un solo siero o di tutti e due insieme. Diluzioni e miscele sono state tenute 2 $^1/_2$-3 ore a 37° C. prima di essere adoperate per le reazioni. Le prove sono state fatte in tubetti di vetro per modo che fossero costanti, in ogni esperimento, il volume del miscuglio e approssimativamente anche la quantità dei batteri, e variassero solo le quantità del siero o dei sieri. La determinazione dei rapporti essendo stata fatta durante la preparazione delle diluzioni e delle

(1) *Experimentelle Beiträge zur Theorie der Agglutination. I. Normalagglutinine.* Centralblatt f. Bakt., I Abt. Orig., XXXVI B., 1904, p. 427.

(2) *Ueber antibakteriolytische (antagonistische) Substanzen normaler Sera.* Deut. med. Woch., 31 Jahrg., 1905, n. 1, p. 6.

miscele, la mescolanza di queste coll'emulsione dei batteri è stata sempre allestita in modo uniforme secondo lo schema:

emulsione dei batteri cmc. 0.90 + diluzione o miscela cmc. 0.10.

I tubetti così preparati sono stati tenuti a 37° C. per 2 ore e poi a temperatura di stanza fino alla 24ª ora.

In ogni esperimento è stata fatta una prova di controllo per eliminare il dubbio di una eventuale agglutinazione spontanea del b. del tifo.

L'osservazione è stata sempre macroscopica. I risultati sono indicati dai segni ±, +, + +, + + +, che significano rispettivamente agglutinazione appena percettibile, netta, nettissima, completa.

In qualche tabella è adoperato il segno > + + per indicare un grado di agglutinazione *quasi completa*. Il segno ? sta a denotare agglutinazione dubbia.

Ciò premesso, presento tre tabelle che mostrano i risultati di alcune delle mie prime esperienze, avvertendo che tanto il siero della cavia, quanto quello del coniglio, nel rapporto 1 : 20000, davano dopo 2 ore un'agglutinazione incipiente, ma netta, sotto forma di minutissimi fiocchettini, e che nel rapporto 1 : 25000 nessuno dei due sieri dava un'agglutinazione macroscopicamente percettibile.

TABELLA I. — *Rapporto complessivo 1:1000.*

QUANTITÀ DEI SIERI	½ ora	1 ora	2 ore	3 ore	6 ore	24 ore
1. Siero cavia 0.001	+ + +	precipitato completo, liquido soprastante limpido	..	..	..	
2. Siero coniglio 0.001	+ + +	id.	..	..	..	
3. Siero cavia 0.0008 + Siero coniglio 0.0002	—	—	+	+ +	+ + +	precipitato scarso (Liquido soprastante uniformemente torbido)
4. Id. 0.0006 + Id. 0.0004	—	—	+	+ +	> + +	id. scarsissimo (Liquido soprastante uniformemente torbido)
5. Id. 0.0005 + Id. 0.0005	—	—	+	+ +	> + +	id. id. (Liquido soprastante uniformemente torbido)
6. Id. 0.0004 + Id. 0.0006	—	—	+	+ +	> + +	id. id. (Liquido soprastante uniformemente torbido)
7 Id. 0.0002 + Id. 0.0008	—	—	+	+ +	> + +	id. id. (Liquido soprastante uniformemente torbido)

TABELLA II. — *Rapporto complessivo 1:5000.*

QUANTITÀ DEI SIERI	½ ora	1 ora	2 ore	4 ore	6 ore	24 ore	
1. Siero cavia 0.0002	—	+ +	+ + +	Precipitato completo, liquido soprastante limpido			
2. Siero coniglio 0.0002	—	> +	+ + +	id.			
3. Siero cavia 0.00016 + Siero coniglio 0.00004	—	—	+ +	+ +	+ +	Precipitato scarso	Liquido soprastante uniformemente torbido.
4. Id. 0.00012 + id. 0.00008	—	—	+	+ +	+ +	Id. id.	
5. Id. 0.0001 + id. 0.0001	—	—	—	+	+	Id. scarsissimo	
6. Id. 0.00008 + id. 0.00012	—	—	±	+	+ +	Id. scarso	
7. Id. 0.00004 + id. 0.00016	—	—	+	+ +	+ +	Id. id.	

Tabella III. — *Rapporto complessivo 1 : 10000.*

Quantità dei sieri	½ ora	1 ora	2 ore	4 ore	6 ore	24 ore
1. Siero cavia 0.0001.	—	±	+	++	++	Precipitato poco abbondante.
2. Siero coniglio 0.0001.	—	±	+	++	++	Id.
3. Siero cavia 0.00008 + Siero coniglio 0.00004	—	—	—	±	±	Id.
4. Id. 0.00006 + id. 0.00002	—	—	—	?	?	Precipitato scarsissimo, come nel controllo.
5. Id. 0.00005 + id. 0.00005	—	—	—	—	—	Id.
6. Id 0.00004 + id. 0.00006	—	—	—	?	?	Id.
7. Id. 0.00002 + id. 00.0008	—	—	—	?	?	Id.

(24 ore, all rows:) Liquido soprastante uniformemente torbido.

Appare dalle tabelle che nelle prove 3-7, dove la quantità complessiva delle agglutinine è approssimativamente eguale a quella che si ha nelle prove 1 e 2, l'agglutinazione è ritardata, affievolita e perfino scomparsa secondo che il rapporto è 1 : 1000, 1 : 5000, 1 : 10000.

Tralascio per ora qualsiasi particolare, e mi fermo a considerare il fenomeno d'interferenza dimostrato dal miscuglio dei due sieri. Parecchie ipotesi si offrono alla spiegazione del fenomeno; ma le più ovvie mi sembrano queste due:

1° o avviene una reciproca neutralizzazione, parziale o totale, fra le tifoagglutinine del coniglio e quelle della cavia;

2° ovvero in uno dei due sieri, o in tutti e due, esistono delle sostanze antagonistiche.

Per risolvere questo dubbio ripetei le esperienze, adoperando miscele di siero agglutinante con siero normale eterologo.

Tolgo dal protocollo una di queste tabelle.

Tabella IV. — *Rapporto 1 : 2000.*

QUANTITÀ DEI SIERI	½ ora	1 ora	2 ore	4 ore	6 ore	24 ore
Siero coniglio immunizzato 0.0005	—	+	+ + +	Precipitato completo, liquido soprastante quasi limpido.	..	
Siero coniglio immunizzato 0.0005 + Siero cavia sana 0.010.	—	—	—	±	±	Precipitato scarsissimo, poco più che nel controllo; liquido soprastante uniformemente torbido.
Siero coniglio immunizzato 0.0005 + Siero cavia sana 0.005.	—	—	—	±	±	
Siero coniglio immunizzato 0.0005 + Siero cavia sana 0.001.	—	—	—	±	±	

NB. Il siero della cavia sana agglutinava il b. typhi nel rapporto di 1 : 10, non in quello di 1 : 25.

Il fenomeno avviene anche, benchè meno spiccato, quando si saggia l'azione della miscela di siero agglutinante di cavia con siero normale di coniglio.

Similmente il siero umano normale esercita un'azione inibitrice sulle agglutinine specifiche del siero di coniglio.

Adoperando concentrazioni più forti di quelle indicate nella tabella, il fenomeno diventa meno netto fino ad essere interamente mascherato.

L'aggiunta di siero normale della stessa specie animale, da cui proviene il siero specifico, non modifica per nulla l'azione agglutinante di questo.

Dunque il fenomeno d'interferenza presentato dalla miscela dei due sieri agglutinanti e dimostrato dalle tabelle I-III, è dovuto all'azione inibitrice di speciali sostanze contenute nel siero di coniglio e aventi azione sulle tifoagglutinine specifiche della cavia e viceversa. Queste sostanze preesistono già nei sieri normali e possono denominarsi, senza pregiudicare l'interpretazione del meccanismo di loro azione, *antiagglutinine normali*.

La quantità delle antiagglutinine normali è piuttosto scarsa, giacchè i fenomeni d'interferenza o d'inibizione si rendono ben manifesti solo adoperando concentrazioni deboli, prossime a quelle che corrispondono al titolo agglutinante limite dei sieri: la determinazione del rapporto più conveniente richiede spesso parecchi tentativi.

Ho inoltre osservato che, se le miscele dei due sieri si tengono a 37° C. per 10-12 ore, l'azione inibitrice scompare e l'agglutinazione avviene con quella stessa rapidità e intensità che si nota nelle prove di controllo.

I sieri normali, tenuti a 12°-15 C. al buio, perdono la proprietà antiagglutinante in tempo relativamente breve (10-15 giorni). Del pari i sieri agglutinanti, conservati nelle stesse condizioni per lo stesso periodo di tempo, non dimostrano più quel caratteristico fenomeno d'interferenza di cui ho parlato.

La presenza di antibatterioagglutinine nei sieri normali mi sembra tanto più importante in qnanto che non è stato finora possibile di ottenerne di specifiche (Kraus, Wassermann).

Ho studiato anche l'azione della temperatura su queste sostanze antiagglutinanti; ma, non avendo ottenuto risultati concordi e sicuri, mi astengo dal parlarne, sopra tutto perchè mi riserbo di ritornare sull'argomento e di riferire intorno ad altre esperienze

istituite alla scopo di stabilire se le antiagglutinine normali siano specifiche o pur no.

Per ora intanto posso affermare che:

1. Nei sieri normali di cavia e di coniglio esistono delle sostanze che inibiscono l'agglutinazione del bacillo del tifo prodotta da sieri specifici eterologhi (antitifoagglutinine normali);

2. Le antitifoagglutinine si trovano anche nel siero umano normale in quantità dimostrabile;

3. Le antitifoagglutinine normali sono relativamente cronolabili;

4. La inibizione prodotta dalle antitifoagglutinine normali deve essere distinta dalla inibizione dovuta alle modificazioni inattive delle agglutinine, ossia agli agglutinoidi specifici o normali.

1° febbraio 1905.

Istituto d'Igiene dell'Università di Pisa

Sul trovato della filtrabilità del virus della rabbia

Nota del Prof. **A. DI VESTEA**.

Nell'ultimo numero di questi Annali, si è svolta una breve polemica tra il dott. Remlinger, direttore dell'Istituto batteriologico di Costantinopoli, e il dott. De Blasi, assistente dell'Istituto d'igiene di Roma, diretto dal prof. Celli, circa la priorità del trovato che il virus della rabbia rientra nella categoria dei cosidetti *virus filtrabili*. Discutendosi se il primo annunzio ne sia stato dato dal Remlinger o dal Celli, evidentemente chi non è addentro nella conoscenza speciale della cosa è indotto a credere, che la parte spettante a me nel trovato medesimo, e *a fortiori* quella spettante ai venuti dopo di me (Bertarelli e Volpino, Schüder, ecc.) sieno una semplice conferma del fatto dell'uno o dell'altro di quei due osservatori. Or siccome nessuno contesta la data precisa con la quale sono apparse *le relazioni degli esperimenti* — unica positiva base di priorità scientifica —; così sia lecito anche a me di mettere bocca nella questione sollevata, premendomi che la verità sia detta intera e formulata in brevi e precise espressioni.

Le prime *relazioni di esperienze dimostranti il passaggio del virus della rabbia per i filtri amicrobici* sono apparse in giugno 1903, e sono due. L'una (13 giugno) è del Remlinger ed espone, anche a nome del suo assistente Riffat-bey, i particolari di *due esperimenti* di filtrazione amicrobica, con risultato affermativo. L'altra, apparsa 15 giorni dopo della precedente (28 giugno), spetta a me e rende conto di *13 esperienze* di filtrazione amicrobica, di cui 6 con risultato affermativo, presentandosi *come un particolare assodato di uno studio più largo e complesso* intorno alla etiologia della rabbia.

In quel giro di tempo, attendendosi dal prof. Celli alla seconda edizione del suo *Manuale dell'Igienista*, il medesimo, in una dispensa che dichiara fosse già stampata e messa in vendita nella prima quindicina di giugno 1903, ha una notizia preliminare con accenno ad

esperienze in corso, « per le quali (egli dice) dovrei conchiudere che il virus rabbico si comporti come un virus filtrabile ». Di che Celli e il suo collaboratore De Blasi *si dimostrano assicurati solo quattro mesi più tardi*, quando s'avevano anche le ricerche analoghe di Schüder e Bertarelli e Volpino, avendo essi dato conto delle loro esperienze la prima volta al Congresso della Società di patologia in Firenze.

Dunque, all'epoca di giugno 1903 si aveva:

a) una *recisa affermazione* di Remlinger, basata sopra due rigorosi esperimenti (ribadita poi con l'altra prova, descritta l'11 luglio successivo);

b) una *recisa affermazione* mia, basata fin dal primo momento sopra 6 prove positive di metodica filtrazione amicrobica (1);

c) una *notizia preliminare* del Celli, in via di accertamento.

Ho voluto precisare le cose così come si sono svolte, perchè nella ricordata nota polemica si accenna da ambo le parti a mettere fuori i registri di laboratorio, a dimostrazione della data in cui ciascuno dei due osservatori cominciò a studiare l'argomento. Chiaro è che, se una data simile potesse far fede in una discussione di priorità scientifica, io, con i miei risultati di 13 esperienze resi già di pubblica ragione in giugno 1903, dovrei trovarmi in condizioni di rivendicare completamente a me la dibattuta priorità. Però io non dubito un momento di affermare che questa, a rigore di cronologia delle *relazioni circa gli esperimenti fatti*, spetta indiscutibilmente a Remlinger e Riffat-bey. Aggiungo anzi (l'ho detto anche altrove), che dei procedimenti tenuti dai vari esperimentatori sull'argomento, per mettere in vista il fatto della amicrobicità dei filtrati, quello del Remlinger è *di tutti il più elegante*, avendo egli (sull'esempio di Nicolle e Adil Bey) aggiunto previamente al materiale rabido da filtrare, non già un comune microbio di facile identificazione, ma un germe micidialissimo per il coniglio (colera dei polli), il quale agisce con una durata d'incubazione incomparabilmente più breve di quella della rabbia. Intanto, pur associandomi al pensiero del De Blasi, che cioè siamo stati in parecchi ad intraprendere nello stesso giro di tempo lo studio dell'argomento,

(1) La mia affermazione era in questi precisi termini: « Per tutte queste precauzioni prese *non mi resta alcun dubbio*, ecc. ». — Cfr. De' più recenti studi circa la natura del Virus rabido, *Giornale italiano delle Scienze mediche*, Pisa 1903.

senza sapere l'uno dell'altro (1), non posso consentire con lui quando, nello stesso punto della sua nota polemica, afferma che Remlinger abbia « più di tutti perseguito la questione con ammirevole perseveranza......, accertando un numero di fatti ben maggiore che non abbiano fatto gli altri autori ».

Considero qui il fatto mio, e tralascio quindi di esaminare fin dove sono arrivati con gli esperimenti loro Bertarelli e Volpino, che pure si sono studiati di andare oltre il semplice dato del carattere filtrabile del virus. Ebbene, se il De Blasi ha letta la mia prima comunicazione, quella del 28 giugno 1903, non può ignorare, che fin d'allora io parlavo di *esperienze di centrifugazione* del filtrato, dimostranti non apportarsi con essa una costante e positiva modificazione al grado suo di virulenza; e che vi discutevo alla stregua del nuovo trovato la dottrina etiologica degli ultramicroscopici e quella sporozoaria, formulando (a proposito di questa e in base a speciali osservazioni) l'ipotesi della probabile *esistenza intracellulare* del germe specifico; tutte cose sulle quali anche Remlinger ha portata la sua attenzione, ma nei suoi scritti posteriori. Inoltre il De Blasi non può ignorare, per la lettura della mia seconda nota dell'8 marzo 1904 (2), che nella medesima non solo si riassume il risultato di 27 esperienze di filtrazione fatte in svariate circostanze, *comprese alcune rifiltrazioni,* ma mi studio di meglio disciplinare la tecnica introducendo il concetto della velocità di filtrazione; parlo di filtrati limpidissimi dimostrati *di virulenza normale* anche alla dose di 0. 1 — 0. 2 cmc.; infine rilevo la proprietà inerente a questi filtrati rabici, per cui essi si ravvicinano ad altri noti virus filtrabili, quella cioè, *da nessun altro fin qui accennata*, di esaurirsi piuttosto sollecitamente, anche conservati al riparo della luce e dell'ossigeno atmosferico. D'altra parte, chiunque si occupa di ricerche etiologiche e patogenetiche sulla rabbia non può ignorare, che il fatto della filtrabilità del relativo virus è venuto fuori dalla mia modesta attività scientifica come uno stadio di sviluppo della lunga serie di pazienti studi, che mi occupano fin da quando nel

---

(1) In verità da varie parti ci siamo messi a studiare contemporaneamente la filtrabilità del virus rabbico. E per vie diverse siamo arrivati a definire un fatto importante, per quanto non decisivo, dell'etiologia della rabbia.

A. Celli.

(2) Cfr. *La Medicina Italiana*; 1904, n.° 13.

1886 organizzai l'Istituto antirabico di Napoli (1), e che hanno, se non m'inganno, fornita la prima prova positiva della dottrina nervosa di quell'infezione, e messa sul tappeto fin dal 1894 (mercè speciali indagini) l'altra della natura microzoica del virus, che si disputa oggi il campo con la dottrina degli ultramicroscopici (2).

Per il quale complesso di cose, credo di aver reso omaggio alla verità e di non aver fatto torto a chicchessia scrivendo, nella mia nota dell'8 marzo 1904, che *il passaggio del virus della rabbia attraverso i filtri amicrobici è un fatto perentoriamente acquistato alla scienza per le ricerche* **simultanee** *di Remlinger e mie e* **posteriori** *di Schüder, Bertarelli e Volpino, Celli e De Blasi.*

Dopo ciò mi resta di ringraziare il prof. Celli per aver ricordata qualcuna delle cose, a cui accennavo testè, nella surricordata sua comunicazione al Congresso di patologia di Firenze; mentre ringrazio il dott. Remlinger, per avermi usata anche questa volta la cortesia di citare il fatto mio accosto al suo, accentuando la intercorrenza di soli 15 giorni.

A chi poi si tien pago d'aver dato a ciascuno il suo, schierando gli sperimentatori sull'argomento l'uno dopo l'altro, come in un calendario, mi permetto di osservare, che la cronologia intesa così fa ricordare del vecchio adagio: « *summum jus, summa injuria* ».

Pisa, 4 gennaio 1905.

---

(1) Anche le nostre esperienze sulla filtrabilità del virus rabbico si rannodano a quelle mie del 1887, con le quali dimostravo l'estrema labilità del virus rabbico, in confronto della resistenza dei batteri patogeni agli agenti fisicochimici.

A. Celli.

(2) Cfr. Di Vestea e Zagari: *La Psichiatria* e *Giornale internazionale delle Scienze mediche*, Napoli 1887; *Fortschritte der Medicin* e *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889.

— Di Vestea e D'Abundo, *Annali di Nevrologia*, 1893.

— Di Vestea, Sulla dottrina nervosa della Rabbia, *Giornale internazionale delle Scienze mediche*, 1890.

— Di Vestea, Nota micrografica sulla Rabbia sperimentale, *Atti della R. Accademia medico-chirurgica di Napoli*, 1894.

Istituto antirabbico di Faenza
ANNESSO ALL'OSPEDALE CIVILE

Sulla presenza e distribuzione dei corpi di Negri in un caso di rabbia umana

pel dott. **AUGUSTO ZACCARIA**, medico-preparatore.

Il recente trovato del Negri (1) circa la presenza di speciali corpi nell'interno delle cellule nervose di animali morti per rabbia, da lui interpretati per sporozoi specifici, non poteva fare a meno di suscitare un interesse generale e di richiamare l'attenzione degli studiosi sulla dottrina etiologica di questa infezione, già messa sul tappeto molti anni prima dal Di Vestea (2), che cioè essa dipendesse dalla invasione d'*un microparassita dell'infima serie animale*. Sollecite e numerose si seguirono infatti le ricerche di controllo al reperto enunciato dal Negri e le esperienze dirette all'interpretazione di detti corpi; cosicchè la letteratura medica potè in breve volger di tempo arricchirsi di un gran materiale di osservazioni, che non valse a fugare le dense tenebre onde è rimasto finora avvolto questo capitolo della patologia della rabbia, ma servì ad aprire l'animo degli studiosi alle più liete speranze di una prossima e completa soluzione dell'arduo problema.

Sono note le accurate ricerce del Daddi (3), Volpino (4), Bertarelli e Volpino (5), Bertarelli (6), Martinotti (7), Guarneri (8), Celli (9), Luschi (10), D'Amato (11), Pace (12), Luzzani (13) e via dicendo. Se però da una parte queste ricerche sono concordi nell'ammettere come reperto costante la presenza dei noti corpuscoli nelle cellule nervose degli animali rabbiosi, dimostrando con ciò esatta l'affermazione del Negri; d'altra parte essendovi le ricerche non meno interessanti e dimostrative del Remlinger e Riffat-bey (14), Di Vestea (15), Bertarelli e Volpino (16), Schüder (17), Celli e De Blasi (18), e di altri (19) sul passaggio di questo agente morboso attraverso i pori della candela Berkefeld, bisogna accogliere con molto riserbo l'interpretazione data dal Negri alle sue inclusioni cellulari, in causa di una certa discrepanza esistente tra il reperto morfologico e il risultato delle esperienze di filtrazione.

Non è mio intendimento entrare in merito alla discussione e pronunciarmi per gli uni o per gli altri esperimentatori, affermando o negando ogni significato etiologico ai corpuscoli del Negri, essendochè molti e validi sono gli argomenti che militano in favore sì dei primi che dei secondi, e perchè ancora prematuro io ritengo un giudizio decisamente affermativo sulla specificità di detti corpi; io voglio solo portare un contributo alla dimostrazione di essi riferendo un caso di rabbia nell'uomo ch'ebbi occasione di osservare nel nostro Istituto antirabbico e di accuratamente studiare sotto le le nuove vedute.

***

È noto che le ricerche finora eseguite sui corpuscoli del Negri vertono quasi tutte su animali (cani, conigli, uccelli) morti per rabbia sì sperimentale come naturale: scarsissime invece sono ancora le ricerche condotte sull'uomo. Le prime osservazioni infatti sui corpi del Negri nell'uomo rabbioso furono fatte da questo stesso (20), ma incompletamente per deficienza di materiale. Questo ricercatore ne constatò la presenza nell'interno delle cellule del Purkinje del cervelletto di una vecchia, morta rabbiosa in seguito a morsicature del labbro inferiore. Segue poscia il Daddi (21) il quale riesce a trovare il parassita nel sistema nervoso di tre uomini morti di rabbia; e qui pure la ricerca, per mancanza di materiale convenientemente preparato, si limita alla sola corteccia cerebrale, dove i noti corpi si rinvengono assai numerosi. Quindi il Pace (22) al Congresso di medicina interna tenutosi a Padova sul finire del 1903, comunica di aver trovato il *neurocitozoo di Negri* nel sistema nervoso di quattro uomini morti rabbiosi, e riferisce a tale proposito che la ricerca fu positiva pel corno d'Ammone e pei gangli cerebrospinali. Alle anzidette tengono dietro le ricerche molto larghe del Bertarelli e Volpino (23) in un bambino di 12 anni morto dopo 52 giorni dalle morsicature ricevute al naso da un cane. Questi ricercatori riferiscono di aver trovato i corpi del Negri nel corno d'Ammone, nel cervelletto e circonvoluzioni cerebrali, mentre li trovarono mancanti nel midollo allungato, nei gangli spinali e gangli del simpatico. Abbiamo infine l'osservazione molto accurata e completa della Luzzani (23) in un bambino di 10 anni, morsicato da un cane alla guancia sinistra e morto circa 40 giorni dopo tale morsicatura. La ricerca del microrganismo del Negri, fu positiva pel corno d'Ammone, cervelletto, ganglio di Gasser, ganglio nodoso del vago e ganglio cervicale superiore del simpatico; negativa pel ponte, midollo allungato e midollo spinale.

Questi i casi di rabbia umana studiati dal punto di vista della ricerca dei corpi di Negri; all'infuori di essi io non so se ne siano stati pubblicati altri tanto nella letteratura medica italiana quanto in quella estera: laonde credo, non senza un certo interesse, ai pochi testè

citati, aggiungere il mio ch'ebbi l'opportunità di accuratamente studiare secondo i metodi indicati dallo stesso Negri, specialmente in riguardo alla presenza e distribuzione dei parassiti suddetti lungo l'asse cerebro-spinale.

Trattasi di un bambino, certo N... A..., di anni 4, nativo di Fermo, morsicato il 3 maggio u. s. e morto il 6 giugno, ossia dopo 35 giorni dalle morsicature avute, coi fenomeni di rabbia furiosa. Le morsicature, assai profonde ed estese, furono inferte da un cane girovago alla regione sopra-orbitale destra e bozza frontale destra. I primi sintomi della malattia insorsero il 4 giugno, e cioè dopo 33 giorni dalle morsicature ricevute e in quarta giornata di cura intensiva. L'autopsia, da me eseguita 24 ore circa dopo la morte, nulla rilevò di anormale, se ne eccettui una certa iperemia delle meningi cerebrali, cui faceva contrasto un'anemia piuttosto marcata di tutti i visceri addominali, specialmente del fegato. Prelevai vari pezzetti di tutto l'asse cerebro-spinale, nonchè pezzi di glandole salivari, e della cicatrice cutanea, sede delle morsicature, allo scopo di ricercarne i corpi di Negri. Da ultimo asportai pezzetti di ciascun organo, per saggiarne la virulenza; ma del risultato di queste ultime ricerche sarà data comunicazione in altra memoria che vedrà la luce fra breve.

I pezzi destinati alla ricerca dei corpi di Negri furono fissati in Zenker; le sezioni colorate in vari modi (eosina-bleu di metilene secondo Fasoli, Maj, Nissl, Romanowscki, ecc.), ma più specialmente col metodo di Mann. E a tal proposito debbo dire che questo metodo, quantunque, per unanime parere, sia il più adatto per iscoprire i corpi del Negri, a me parve non servisse sempre bene per apprezzare i rapporti fra i corpi del Negri e il protoplasma cellulare; poichè la tinta assunta dal protoplasma, differendo talvolta assai poco da quella assunta dal tessuto interstiziale, riesce malagevole giudicare qualche volta se il parassita trovisi entro o fuori della cellula il che, come si comprende, è della più grande importanza. Ricorsi pertanto, come giustamente consiglia il D'Amato, spesse volte al metodo di Nissl, specie quando mi premeva di metter bene in evidenza il protoplasma cellulare dal tessuto interstiziale.

Ed ecco in succinto i risultati ottenuti dalle mie ricerche:

Cervello. — I corpi di Negri si trovano in iscarso numero nelle cellule piramidali delle circonvoluzioni cerebrali, mentre abbondano nel corno d'Ammone, ove sono molto ben evidenti e sviluppati. La maggior parte delle cellule piramidali del corno d'Ammone contiene uno o più parassiti, di varia grandezza (da 2 a 6 μ circa) con predominio però delle forme di media grandezza. Tutte poi lasciano nettamente scorgere un' intima struttura, quale fu bene descritta dal Negri, e dagli altri ricercatori e ch' io reputo superfluo di qui riportare. Mancano invece in tutte le altre regioni del cervello, e cioè nei nuclei della base, corpo calloso, ponte, tubercoli quadrigemini, ecc.

La maggior parte dei parassiti sono tangenziali od assai prossimi al nucleo; altri risiedono in mezzo al protoplasma cellulare o nei prolungamenti stessi delle cellule. Rammento ancora come ultima particolarità le solite formazioni granulari tingibili in rosso dall'eosina entro al protoplasma delle cellule piramidali del corno d'Ammone, osservate già dalla maggioranza dei precedenti ricercatori in consimili casi [Bertarelli e Volpino (23), Daddi (3), Luzzani, ecc. (13)].

Cervelletto, ponte, midollo allungato e midollo spinale. — L'esame ripetuto su numerosissime sezioni di queste parti, permise di constatare la presenza dei corpi di Negri soltanto nelle cellule del Purkinje del cervelletto: negativa fu constantemente la ricerca nel ponte, midollo allungato e midollo spinale, il quale venne sezionato ed esaminato a varie altezze, e cioè nella sua porzione cervicale, dorsale e lombare.

Ganglî Gasser, simpatico, vago e ganglî spinali. — In tutti questi ganglî non fu possibile constatare un solo parassita; per cui devesi ritenere o che manchino assolutamente o che siano in numero estremamente esiguo. Sono invece molto appariscenti ed evidentissime le lesioni speciali del Van-Gehuchten e Nelis, specialmente nel ganglio nodoso del vago.

Mi preme infine riferire che tanto nelle glandole sottomascellari, linguali e parotidi, quanto nella cute, sede delle morsicature, e nello sciatico, la ricerca degli elementi analoghi a quelli rinvenuti entro le cellule nervose, riuscì del tutto infruttuosa, nonostante che la più accurata diligenza ed attenzione fosse messa in opra e che l'inoculazione subdurale praticata nel coniglio con pezzetti delle predette glandole e nervo ne avesse dimostrata la virulenza colla morte per rabbia degli animali inoculati. Ma di tali ricerche, come già si disse più sopra, sarà fatta dettagliata menzione in altro lavoro.

Onde, riassumendo, possiamo dire che il reperto dei corpi di Negri fu positivo solo pel corno d'Ammone, in cui trovaronsi in grande quantità, pel cervelletto in mediocre numero e per le circonvoluzioni cerebrali, ove si riscontrarono in scarsa copia. Mancavano poi assolutamente in tutte le altre regioni dell'asse cerebrospinale e più precisamente nei nuclei della base, nel ponte, nel bulbo, midollo spinale e ganglî cervico-spinali.

***

Ed ora poche considerazioni sul risultato delle ricerche suesposte.

Il fatto che prima d'ogni altro merita di essere rilevato, è senza dubbio l'abbondanza di forme parassitarie riscontrate nel corno d'Ammone. Fu qui invero dove noi le trovammo non solo in maggior numero, ma eziandio maggiormente sviluppate, tanto da potersi considerare questa regione la sede di predilezione, od in altri termini, il centro dell'infezione; laddove la presenza di questi singolari corpi che niuno certo oserebbe scambiare con elementi comuni, vedemmo farsi gradatamente meno vistosa e mancare del tutto a mano a mano che l'osservazione nostra si allontanava dal corno d'Ammone.

Questa diversa distribuzione dei corpi di Negri nel sistema nervoso di animali rabbiosi fu analogamente riscontrata da tutti quanti gli osservatori che di simile argomento si occuparono, ed il Negri stesso nella sua prima memoria aveva già accennato e poi più tardi con osservazioni ripetute dimostrato che si hanno differenze nella localizzazione delle forme endocellulari del presunto parassita, a seconda della via d'ingresso dell'infezione. Così egli aveva osservato che nei cani, morti di rabbia furiosa, le forme parassitarie si rinvengono localizzate sopratutto nell'encefalo dove sono numerosissime e ben sviluppate, specialmente poi se l'animale era morto parecchi giorni (15–16) dopo l'inoculazione. Nella rabbia paralitica al contrario, il microrganismo si riscontrava sopratutto nei gangli spinali, raramente nel midollo spinale e nell'encefalo, dove del resto poteva anche mancare del tutto.

Questa distribuzione così diversa dei corpi di Negri, lungo l'asse cerebro-spinale, troverebbe la sua ragione d'essere nel diverso quadro clinico presentato in vita dall'individuo malato, e verrebbe a darci spiegazione abbastanza facile e soddisfacente della sintomatologia così svariata che questa forma morbosa presenta a seconda dei casi.

Se non che il fatto di riscontrarli assai scarsi, anzi del tutto mancanti nel bulbo, come pure in tutte le altre parti del sistema nervoso (midollo, gangli e nervi) più fortemente interessate nell'idrofobia, non possono far a meno di sollevare gravi dubbi e metterci giustamente in un prudente riserbo circa l'interpretazione data dal Negri al suo reperto.

E per vero, come mai può spiegarsi il fatto di vederli così ab-

bondanti in certe parti del sistema nervoso, come il corno d'Ammone, che, giusta le odierne nostre cognizioni, non avrebbero alcun rapporto coi sintomi della malattia, e mancare poi nel bulbo che è pure tanto vicino a quello e che sappiamo più virulento? Di più il mancare essi in tessuti virulenti, come le glandole salivari [Daddi (3), Bertarelli e Volpino (23)] il non averli riscontrati, come è occorso al Luschi, nel midollo lombare e nei gangli intervertebrali di conigli infettati per la via dello sciatico ed uccisi precocemente avanti la comparsa dei primi sintomi, ma quando il concomitante controllo sperimentale dimostrava esistere già in quelle parti il virus della rabbia, ci inducono a ritenere che i corpuscoli del Negri non rappresentino la vera causa specifica dell'infezione rabida, o per lo meno non siano tutta la causa di questa malattia. E che non siano tutto il parassita risulta eziandio dalle molte ed accurate ricerche fatte sulla filtrabilità del virus rabido, da cui lo Schüder prende senz'altro argomento per escludere recisamente che i corpuscoli del Negri possano aver che fare con l'agente specifico della rabbia. Il Di Vestea però non va tanto oltre e più giustamente fa osservare che il presunto parassita potrebbe presentarsi filtrabile con forme corrispondenti a speciali stadî del ciclo di sviluppo. Anche il Celli e De Blasi (18), Bertarelli e Volpino (5) hanno ammesso tale possibilità, e alcune ricerche recentissime hanno permesso di constatare che questo fatto accade realmente per alcuni protozoi (*micromonas Mesnili* e *trypanosoma Lewisi*).

Per cui « se la prova di passaggio pei filtri di porcellana, come ben dice il Di Vestea (15), non contraddice all'ipotesi che il virus rabido abbia per rappresentante morfologico un protozoo (poichè il passaggio o non d'un virus dipende da ciscostanze molteplici, quali la pressione e il grado di porosità del filtro, diluizione più o meno forte e qualità del mestruo, temperatura dell'ambiente durante la filtrazione, durata di questa, la natura degli elementi figurati, secondo che hanno forma rotonda o allungata, sono mobili o no e via dicendo) dimostra però che senza escludere la possibilità di simultanee forme corpuscolari grandi, il virus rabido debba avere per rappresentante morfologico elementi di un'estrema piccolezza ».

Riassumendo possiam dunque dire che i corpi del Negri per la speciale struttura loro, pel trovarsi entro elementi assai bene conservati, pel vederli persistere colle loro note caratteristiche anche nel sistema nervoso in avanzata putrefazione; per vederli conservati dopo lungo soggiorno in glicerina e pel comportarsi loro di fronte a certi agenti fisici e chimici [Negri (1), Daddi (3), Berta-

relli (6)], pel riscontrarsi costantemente e solo nei casi di rabbia [Dominici (24), Marzocchi (25)], se ci fanno propendere a considerarli aventi rapporto col microparassita della rabbia, essi però non ne rappresentano tutto il parassita, e perchè mancano in tessuti ed organi virulentissimi (bulbo, gangli, nervi, glandole salivari, ecc.), e perchè passano attraverso i pori della porcellana, e perchè infine non fu possibile scorgere un intimo nesso « tra le fasi morfologiche di questi corpuscoli e le fasi nosologiche del processo infettivo ».

E qui mi sia permesso di riportare le belle parole con cui il mio illustre maestro, prof. Di Vestea (15) chiudeva il suo lavoro « *Dei più recenti studî circa la natura del virus rabido* »: « siamo, come si vede, a fronte di un problema ancora moltissimo complicato, ma in una fase della relativa discussione che apre l'animo alle più liete speranze ».

Faenza, 26 dicembre 1904.

BIBLIOGRAFIA.

1. Negri. *Contributo allo studio dell'etiologia della rabbia.* Bollettino della Società medico-chirurgica di Pavia. Comunicazione del 27 marzo 1903.

— Id. *I risultati delle nuove ricerche sull'etiologia della rabbia.* Lo Sperimentale, anno LVII, fasc. 2°.

2. Di Vestea. *Nota micrografica sulla rabbia sperimentale del coniglio.* Atti della R. Accademia medico-chirurgica di Napoli, 1894.

3. Daddi. *Sull'etiologia dell'idrofobia.* Rivista critica di clinica medica, anno V, n. 21, 22, 1904 e n. 22, 1903.

4. Volpino. *Sulla diagnosi istologica della rabbia.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, anno XIV, 1903.

5. Bertarelli e Volpino. *Ricerche e osservazioni sperimentali sulla rabbia.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, anno XIV, 1903.

6. Bertarelli. *Sui rapporti tra le modificazioni di virulenza del virus rabbico e le modificazioni dei corpi di Negri.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, anno XIV, 1903.

7. Martinotti. *Alcune osservazioni e considerazioni su cervelli e gangli spinali di conigli morti per infezione di virus rabico.* Giornale della R. Accademia di medicina di Torino, n. 6, 1903.

8. Guarnieri. *Rendiconto della seconda riunione della Società italiana di patologia.* Lo Sperimentale, anno LVII, fasc. 6°.

9. Celli. Ibidem.

10. Luschi. Cfr. Di Vestea. *Ulteriori osservazioni circa la filtrabilità del virus rabico.* La Medicina italiana, 1904, n. 13.

11. D'Amato. *Sull'etiologia della rabbia.* Estratto dagli Atti del Congresso di medicina interna tenuto in Padova nell'ottobre 1903 e Gazzetta degli ospedali, novembre 1903.

— Id. *I corpi di Negri in rapporto all'etiologia e alla diagnosi della rabbia.* Riforma medica, anno XX, n. 23, 1904.

12. Pace. *Sopra alcune speciali formazioni eosinofile, simulanti i corpi di Negri nelle cellule dei gangli cerebro-spinali dell'uomo idrofobo.* Riforma medica, anno XX, n. 25, 1904.

— Id. *Osservazioni e ricerche sulla rabbia.* Atti del Congresso di medicina interna tenuto a Padova nell'ottobre 1903 e Gazzetta degli ospedali, novembre 1903.

13. Luzzani. *La dimostrazione del parassita specifico in un caso di rabbia nell'uomo.* Bollettino della Società medico-chirurgica di Pavia, 22 gennaio 1904.

14. Remlinger e Riffat-bey. *Le virus rabique traverse la bougie Berkefeld.* Compt. rendu Société de biologie, 13 giugno e 11 luglio 1903.

15. Di Vestea. *Dei più recenti studî circa la natura del virus rabido.* Il Giornale italiano delle scienze mediche, anno I, n. 6, 7.

— Id. *Ulteriori osservazioni circa la filtrabilità del virus rabido.* La Medicina italiana, anno II, 30 aprile, n. 13.

16. Bertarelli e Volpino. Loco citato sopra.

17. Schüder. *Der Negri'schen Erreger der Tollwuth.* Deut. med. Wochenschrift, settembre 1903.

18. Celli e De Blasi. *Ist das Wuthgift filtriebar?* Deut. med. Wochenschrift, n. 50, 1903 ed Atti del 2° Congresso della Società italiana di patologia in Firenze, nei giorni 5, 6, 7 ottobre 1903.

19. Centanni. Ibidem.

20. Negri. Loco su citato.

21. Daddi. Loco su citato.

22. Pace. Loco su citato.

23. Bertarelli e Volpino. *Osservazioni morfologiche e biologiche sopra un caso di rabbia umana, con speciale riguardo alla presenza e distribuzione dei corpi di Negri nel sistema nervoso centrale.* Giornale della R. Accademia medica di Torino, n. 6, 1903.

23. Luzzani. Loco su citato.

24. Dominici: *Sul valore della diagnosi istologica della rabbia. Nota preliminare.* Il Policlinico. Sez. pratica, anno XI, n. 29, 1904.

25. Marzocchi. *Contributo alla questione della specificità dei corpi di Negri.* Archivio per le scienze mediche, 1904.

Laboratorio batteriologico e medico-micrografico
della Sanità pubblica

Contributo alle conoscenze sui paratifi

per il dott. A. PALADINO-BLANDINI, assistente.

È capitato a me di isolare da un campione di acqua di sorgente, destinata, assieme ad altre e con esse convogliata, allo approvvigionamento idrico di uno dei comuni della Calabria, un germe, patogeno per alcuni animali da esperimento, e la di cui morfologia, e le proprietà biologiche e culturali, mi inducono a designare come un paratifo tipo *A* (Brion-Kayser).

Clinicamente il fatto che vi sono tipi di malattia che decorrono presso a poco col quadro classico del tifo addominale, e che con esso non hanno poi comuni le lesioni anatomo-patologiche, ancora prima della scoperta del bacillo di Eberth, era già stato notato — ne ricordo uno — da Babes. Ma lo accertamento indiscutibile del fatto che vicino alla malattia eberthiana, un'altra ne esiste che ha con essa analoghi se non identici i sintomi ed il decorso, ma che è di essa però meno funesta, e che è causata da un agente morbigeno a sè, ed esattamente definibile, è questa una conquista recente della batteriologia. La scoperta ebbe il suo primo nascere in Francia, dove Achard e Bensaude (1) poterono per i primi isolare da un ammalato, che sembrava di tifo, un germe che pur essendo differente dal bacillo di Eberth, aveva però con esso molti punti di contatto e che essi chiamarono *paratifo*, nome a cui, per le obbiezioni fatte da Widal, si sostituì quello di *paracolibacillo*. Seguirono altre osservazioni di autori francesi e americani, fra cui citerò Widal e Nobécourt (2), Gwyn (3), Cushing (4), ecc., i quali comunicavano i casi di malati in apparenza tifosi, nei quali la siero-reazione di Widal riusciva negativa per il tifo, e dalle cui urine, dal sangue, dal pus di suppurazioni secondarie si poterono ottenere culture di un germe che

dal bacillo del tifo si poteva distinguere oltre che per la sua sensibilità all'azione agglutinante del siero degli ammalati da cui proveniva, anche per la sua capacità di dar luogo alla fermentazione dello zucchero.

Fu però solo e per il primo Schottmüller (5) che nel 1900-1901 ci diede le sue ricerche batteriologiche sistematiche eseguite su 7 malati in Amburgo, da cui è possibile trarre sufficienti punti di orientamento per la distinzione dei paratifi in due gruppi a parte, ognuno caratterizzato da essenziali note di differenza dall'altro; l'autore conchiudeva, nel suo lavoro del 1901, dicendo che bisognava *forse* indicare i casi di malattia come *paratifo*, e indicare col nome di *paratifo-bacilli* i germi che se ne ottengono.

Quasi contemporaneamente a questo lavoro di Schottmüller, con un lavoro pubblicato da Kurth (6). la terminologia batteriologica accenna a ricomplicarsi; in quanto che vediamo comparire sulla scena, per opera di questo autore, un *bacillus Bremensis foebris gastricae* isolato da 5 pazienti da lui osservati a Brema, e che ora, date le sue proprietà biologiche e culturali, possiamo identificare col bacillo paratifo, tipo *B* (Schottmüller).

Nell'anno seguente Brion e Kayser (7) dopo avere riferito su un caso di paratifo osservato a Strasburgo, dicono di avere isolato dal sangue dell'ammalato un germe simile al bacillo del tifo, agglutinabile dal siero di sangue dell'ammalato in proporzione di 1 : 1000, a differenza del bacillo di Eberth che non veniva agglutinato, e ne traggono occasione per aggruppare i paratifi descritti da Schottmüller in due categorie: paratifo tipo *A* e paratifo tipo *B*, e assegnano al primo tipo due dei sette campioni di paratifo isolati da questo autore, e al tipo *B* gli altri cinque campioni, il germe da loro isolato in questo caso osservato, il bacillo di Brema (Kurth), e molto probabilmente anche il *b. monadiforme*, il *b. Breslaviense*, il *b. Friedbergensis*, e il *b. morbificansbovis* [Forster-Basenau (8)], a cui, secondo le ricerche di Drigalsky (9) si potrebbero anche aggiungere col suo *b. von Neuenkirhen*, il *b. enteritidis Gärtner*, e l'*hog-colera*, come ancora il « *Saarbruckener Stäbchen* » descritto da Conradi, Drigalsky e Jurgens (9-*bis*) come causa dei 38 casi di *tifoide* avvenuti fra i militari di Saarbrücken.

Alle osservazioni di Schottmüller, ed a quelle di Brion e Kayser, seguivano poi nuove osservazioni che le prime venivano a confermare, osservazioni di De Feifer e Kayser (10), di Stern (11), di Sion e Negel (12), di Coleman-Buxton (13), di Hewlett (14), di Brion (15), Bruns e Kayser (16), Allaria (17), Fischer (18), Drigalsky (19), G. Ascoli (20), ecc., con un numero complessivo di poco più di 250 casi, nella loro grande maggioranza appartenenti al b. paratifo tipo *B* (Schottmüller), mentre devono riservarsi al b. paratifo tipo *A* (Brion-Kayser), dieci casi in tutto.

Ora, dato il numero limitato dei casi caduti sotto l'osservazione dei vari ricercatori, dato ancora che le stesse scarse osservazioni sono state fatte più su casi sporadici qua e là manifestatisi, che su veri focolai epidemici del morbo, facilmente si intende come scarse debbano essere le nostre cognizioni sulla sua epidemiologia; così a noi è dato semplicemente dire che il paratifo è, come già avanti stato ricordato, una malattia più benigna del tifo addominale in quanto che per essó si ha una mortalità fra i colpiti solo

dell' 1·2 per cento di fronte alla cifra rispettiva di 11 per cento data dalla infezione eberthiana, e che molto verosimilmente, al modo stesso di quest'ultima, non ha una patria speciale perchè casi di paratifo sono stati osservati in America, in Germania, in Rumania, in Francia, nell'Olanda, in Italia. Per ciò che riguarda poi i mezzi di diffusione dobbiamo per ora limitarci a rilevare quello che è stato per ora rilevato da Kurth a Brema, da Fischer a Kiel, da Drigalsky a Neuenkirchen, da Drigalsky, Corradi e Jurgens a Saarbrücken e ammettere con Neufeld (21) che la diffusione della malattia si debba alle ingestioni di carni, specificamente infette, di vacca o di cavallo. Ed è appunto per queste ragioni che mi pare di far cosa non priva di interesse riferendo sulla presenza da me potuta constatare di un bacillo paratifo nelle acque potabili di un comune in cui casi di tifoide si sono verificati e pare ancora continuino a verificarsi.

Pervenivano, nello scorso dicembre a questo laboratorio. dei campioni di acqua dal Comune di P.... in Calabria; e il medico provinciale del luogo dopo avere avvertito che le numerose cause di inquinamento delle sorgenti, le facevano a buon diritto sospettare come non igienicamente potabili, avvertiva come molto probabilmente all'uso di queste acque impure dovessero attribuirsi un certo numero di casi diagnosticati come febbre tifoidea, intervenuti durante l'anno fra la popolazione del Comune. Avendo chiesto ulteriori informazioni sulla entità e sul numero dei casi di tifo avveratisi nell'annata in quel Comune, il medico provinciale, con cortese sollecitudine mi informava che — per quello che il locale ufficiale sanitario asseriva — « casi classici di ileo-tifo sono stati osservati in quella città nel seguente numero: un caso in febbraio, uno in maggio, uno in agosto, uno in settembre, uno in ottobre ed uno in novembre »..... e che per quanto il tipo anomalo della febbre nel 1° settenario potesse far propendere più per una diagnosi di influenza che di tifo, tuttavia egli era convinto che casi veri d'infezione tifoidea nel mese di dicembre — cioè nel mese in cui scriveva — esistessero sul posto.

Date queste condizioni fu mia cura eseguire sui campioni d'acqua inviati per l'analisi batteriologica, delle ricerche speciali tendenti a stabilire se nei campioni stessi poteva essere accertata la presenza del bacillo del tifo, e come prima prova, oltre a fare le comuni e abituali semine in agar e gelatina ordinari, feci anche delle semine in agar di Drigalsky-Corradi riserbandomi nel caso che la ricerca fosse riuscita negativa di richiedere nuovi campioni, con quantità di acqua sufficiente per potere eseguire la ricerca col metodo di Parietti, e con quello di Roth e Ficker (brodo caffeinato).

Fui però fortunato; in quanto che dopo 48 ore di incubazione a 37°, potevo constatare sulle piatte di Drigalsky delle colonie

bluastre, tondeggianti, ma con bordo non perfettamente regolare, colonie che osservate al microscopio si mostravano prive di nucleo centrale più marcatamente colorato, granulose finemente, e con delicata striatura superficiale. Alle prime prove culturali potei convincermi di avere sotto mano un germe di forma bacillare, dotato di attivi movimenti di traslazione, germe che si colorava con tutti i comuni colori di anilina, non resistente al Gram, incapace di coagulare il latte e di fondere la gelatina. Inoculai una cavia di 300 grammi nel peritoneo con 2 cmc. di brodo-cultura di 24 ore e la cavia morì di setticemia, constatata per gl'innesti nei comuni terreni di nutrizione fatti dal sangue e dalla milza. Eseguii allora la prova della agglutinazione con un siero-tifo discretamente attivo (1 : 800 su bacillo del tifo), ma essa riuscì negativa anche in una diluizione di 1 : 100.

Mi sorse allora il sospetto che avessi da fare con un paratifo, e poichè mi trovavo ad avere sotto mano due culture, una di *paratifo A*, e l'altra di *paratifo B* già in precedenza fatti venire dell'Istituto del Kral, cominciai uno studio sistematico comparativo del bacillo isolato, che dal nome della sorgente d'onde veniva l'acqua che lo conteneva, chiamerò per brevità *Pantanello*, dei due paratifi di Kral, di due campioni del bacillo tifico di differente provenienza e di un bacillo *coli*, studio comparativo i cui risultati, per brevità e per maggior chiarezza riassumerò nelle seguenti tabelle:

TABELLA I. — *Culture sui più comuni terreni nutritivi.*

Batteri	Brodo-peptone	Agar (per strisciamento)	Gelatina (per infissione)	Patate	Latte
B. tifo laboratorio . .	Intorbida il brodo uniformemente, e dà un lieve deposito al fondo del tubo. Assenza di pellicola in superficie	Patina grigiastra leggermente rilevata sulla superficie dell'agar, umida, splendente, a riflessi bluastri, con bordi finamente seghettati	Non fonde	Patina lieve, incolore, sensibile solo con lo strisciarvi l'ansa di platino	Dopo 2 settimane di incubazione a 37° nessun mutamento nè di aspetto, nè di reazione.
B. tifo Napoli . . .	Come il precedente. . . .	Come il precedente . . .	Id.	Id.	Come il precedente.
B. paratifo *A* . . .	Come il precedente; cospicuo deposito al fondo	Come il precedente . . .	Id.	Id.	Come il precedente.
B. paratifo *B*. . . .	Come il b. tifo laboratorio.	Patina bianco-grigiastra, rilevata, succulenta, a bordi regolari. Iridescenza	Id.	Patina bianco-gialletta; nettamente visibile	Reazione del latte dopo 2 settimane di incubazione a 37° alcalina; nessun rischiaramento visibile del terreno nutritivo.
B. Pentanello. . . .	Come il precedente . . .	Come il paratifo *B* . . .	Id.	Come il paratifo *A*	Come il paratifo *A*.
B. coli	Intorbidamento e deposito al fondo come i due tifi; lieve pellicola in superficie	Come il precedente . . .	Id.	Patina giallo-bruna, rilevata	Coagulato dopo 48 ore di incubazione. Reazione acida.

NB. In questa, come in tutte le altre tabelle in cui non sia specificatamente detto, l'aspetto delle culture va riferito a quello che si osserva dopo una incubazione di 24 ore a 37°, tranne che per la gelatina per la quale si intende parlare di culture di 5 giorni tenute a 20° C.

TABELLA II.

Culture a piatto; aspetto delle colonie (ingrandimento di 70 diametri).

Batteri	Su gelatina di Piorkowsky (30 ore di incubazione)	Su agar di Drigalsky
B. tifo laboratorio	Colonie opalescenti grigiastre (superficiali) a bordo non perfettamente regolare, con parte centrale più oscura e che fa come da centro ad un sistema di raggi che vanno dal centro alla periferia.	Colonia a guscio d'ostrica con striatura però poco evidente; piglia il colore bluastro del terreno nutritivo.
B. tifo Napoli . .	Come il precedente; la striatura raggiata è molto evidente.	Come il precedente.
B. paratifo *A* . .	Colonie tondeggianti a bordo leggermente sinuoso, grigiastre, opalescenti. Non è evidente un sistema di raggi alla sua superficie; ha aspetto piuttosto uniformemente granuloso.	Aspetto a guscio d'ostrica evidentissimo; colonie leggermente bluastre.
B. paratifo *B* . .	Colonie ovalari o tondeggianti, granulose uniformemente, di colorito tendente al gialletto, senza striatura raggiata superficiale; qualcuna si mostra anche nucleata.	Colonie a bordo fortemente sinuoso, con sottile striatura radiata solo alla parte centrale, di colorito violaceo.
B. Pantanello . .	Colonie a bordo non perfettamente regolare, tondeggianti, di colorito grigiastro, con striatura superficiale delicata non molto evidente.	Colonie tondeggianti, a bordo sinuoso, granulose, con striatura superficiale finemente ondulata. Piglia il colore violaceo del sostrato nutritivo.
B. coli	Colonie nettamente tondeggianti, a bordo regolare, opache, granulose uniformemente, nettamente giallastre.	Colonie rotonde, uniformemente granulose, di color rosso.

TABELLA III.

Esito della ricerca dell'indolo (cultura di 5 giorni a 37°).

Batteri	Reazione di Salkowsky	Reazione di Weil-Legal	Reazione di Nencki	Reazione di Crisafulli
B. tifo laboratorio	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
B. tifo Napoli . .	Id.	Id.	Id.	Id.
B. paratifo *A* . .	Id.	Id.	Id.	Id.
B. paratifo *B* . .	Id.	Id.	Id.	Id.
B. Pantanello . .	Id.	Id.	Id.	Id.
B. coli	Positiva	Positiva (con ritardo)	Positiva	Positiva

TABELLA IV.

Potere di fermentazione degli zuccheri.

	Zuccheri adoperati	B. tifo laboratorio	B. tifo Napoli	B. paratifo A	B. paratifo B	B. Pantanello	B. coli
Monosaccaridi	Destrosio . . .	—	—	++	++	+	+++
	Galattosio . . .	—	—	+	++	+	+++
	Fruttosio . . .	—	—	+	++	+	++
Disaccaridi. .	Saccarosio. . .	—	—	+	++	+	+++
	Maltosio. . . .	—	—	+	+++	+	+++
	Lattosio. . . .	—	—	+	++	+	+++
Polisaccaridi .	Destrina. . . .	—	—	+	++	+	++
	Inulina	—	—	—	+	—	++
Exiti. . . .	Dulcite	—	—	+	+++	+	+++

A spiegazione della tabella precedente, dirò che il segno — indica che la prova è riuscita negativa, il segno + indica che si ha la formazione di qualche bolla di gas, il segno ++ che la produzione di gas è considerevole, il segno +++ che la quantità di gas prodottasi è tale da spezzettare l'agar; dirò ancora che le prove sono state fatte aggiungendo all'agar nutritivo ordinario il 2 per cento delle singole qualità di zucchero, e che l'agar così preparato veniva fatto solidificare, in quantità di cmc. 8, a cilindro, entro tubi da saggio. L'innesto dei germi in esame veniva praticato, in questi ora descritti terreni nutritivi, per infissione. Aggiungerò poi che da quanto è nella precedente tabella segnato, una contradizione appare manifestarsi in rapporto a quello che sappiamo sulle proprietà di fermentazione degli zuccheri per opera del bacillo di Eberth. È difatti riconosciuta come fondamentale proprietà di tale germe quella di non attaccare i polisaccaridi e i disaccaridi, ma di decompórre i monosaccaridi, mentre dai risultati da me ottenuti parrebbe che il b. del tifo non attacca nessuno degli zuccheri presi in esame. Ora, la contradizione non è che apparente, in quanto che — come dalle esperienze del Peré (22) risulta — la fermentazione dei monosacca-

ridi (glucosio) per opera del b. del tifo si compie lentissimamente, tanto che la coagulazione di un tubo di latte addizionato di glucosio e tenuto a 37° previo innesto con questo germe, non avviene se non che in 8ª, 9ª giornata. I miei saggi invece, tenuto conto dello scopo puramente comparativo con cui essi sono stati fatti, si riferiscono solo a quello che si vede accadere nei tubi di cultura dopo una incubazione di 48 ore.

A risultati, difatti, più dimostrativi si perviene aggiungendo all'agar preparato nella maniera ora ricordata, un decimo di centimetro cubico per ogni tubo di cultura, di tintura di laccamuffa (Kubel-Tiemann), la quale — ad evitare l'azione riducente del sostrato di nutrizione — veniva sterilizzata a parte e addizionata poi all'agar fuso e mantenuto a 45°. Non si tratta, come si vede, che dell'agar di Wurtz, con la differenza che al lattosio sono stati sostituiti i diversi zuccheri ora citati, e alla semplice tintura di laccamuffa, la tintura preparata secondo Kubel e Tiemann.

TABELLA V. — *Culture in agar zucchera*

	Zuccheri adoperati	B. tifo laboratorio		B. tifo Napoli	
		Aspetto della cultura	Reazione	Aspetto della cultura	Reazione
Monosaccaridi.	Destrosio. . . .	Agar decolorato in profondità; in superficie lieve anello roseo non molto distinto	Debolmente acida	Come il precedente	Debolmente acida
	Galattosio . . .	Agar decolorato in profondità; in superficie lieve anello violaceo	Id. (?)	Agar decolorato in profondità; in superficie lieve anello roseo (?)	Id.
	Fruttosio	Agar scolorato con lieve anello roseo in superficie	Debolmente acida	Come il precedente	Id.
Disaccaridi . .	Saccarosio . . .	Agar scolorato con lieve anello bluastro in superficie	Debolmente alcalina	Id.	Debolmente alcalina
	Maltosio	Agar scolorato con anello violaceo in superficie	Id.	Id.	Id.
	Lattosio	Agar scolorato; in superficie permane un anello bluastro	Id.	Id.	Id.
Polisaccaridi .	Destrina	Agar scolorato con anello violaceo in superficie	Id.	Id.	Id.
	Inulina . . .	Id.	Id.	Id.	Id.
Exiti	Dulcite	Agar scolorato con anello bluastro in superficie	Alcalina	Id.	Id.

laccamuffa (cultura di 72 ore).

B. paratifo *A*		B. paratifo *B*		B. Pantanello		B. coli	
Aspetto della cultura	Reazione	Aspetto della cultura	Reazione	Aspetto della cultura	Reazione	Aspetto della cultura	Reazione
Agar come il tifo laboratorio	Acida	Agar rosso. Incipiente decolorazione in profondità	Acida	Come il paratifo *A*	Acida	Agar rosso; nessun accenno di decolorazione	Acida
Agar decolorato in profondità; in superficie anello roseo	Id.	Agar decolorato in profondità. In superficie anello rosso.	Id.	Id.	Id. (?)	Agar rosso; lieve decolorazione in profondità	Id.
Agar scolorato; anello rosso in superficie	Id.	Come il precedente	Id.	Come il precedente	Acida	Come il precedente	Id.
Agar scolorato; anello roseo in superficie	Acida debole	Incipiente decolorazione dell' agar in profondità; anello rosso in superficie	Id.	Come il paratifo *A*	Id.	Agar arrossato in totalità; nessun accenno di scolorazione	Id.
Agar decolorato con anello violaceo (?) in superficie	Id.	Agar scolorato con anello roseo in superficie	Id.	Agar scolorato con lieve anello violaceo in superficie	Debolmente acida	Agar scolorato quasi in totalità; anello rosso superficialmente	Id.
Agar decolorato solo in profondità; in alto mantiene il suo colore violaceo	Debolmente alcalina	Agar decolorato in profondità. In superficie anello violaceo	Debolmente acida	Come il paratifo *A*	Debolmente alcalina	Agar interamente arrossato; nessuna scolorazione	Id.
Agar scolorato; anello violaceo in superficie	Neutra	Come il precedente	Acida	Id.	Id.	Id.	Id.
Id.	Debolmente alcalina	Id.	Id.	Id.	Id.	Agar scolorato in parte; rosso in superficie	Id.
Agar scolorato; anello bleu in superficie	Id.	Agar scolorato. Anello violaceo in superficie	Neutra	Id.	Neutra	Agar arrossato, poco scolorato	Id.

Si può quindi, servendosi di un indicatore come la laccamuffa, correggere quell'apparente errore fondato sull'assenza di produzione di gas e su cui sono basati i dati riassunti ed esposti nella precedente tabella, e riconfermando ancora una volta la proprietà del b. del tifo di decomporre fra tutti gli zuccheri solo i monosaccaridi, dire — come è già stato notato — che una differenza sostanziale fra il tifo e i paratifi sta nella capacità di questi di dar luogo alla fermentazione dei monosaccaridi non solo, ma anche dei di - e dei polisaccaridi. Ho voluto poi esporre per esteso i risultati di queste esperienze perchè da esse un fatto nuovo viene ad essere posto in rilievo: la capacità del b. del tifo — in parte condivisa dai paratifi — di decolorare la laccamuffa in terreni zuccherati. Questa decolorazione nei tubi di cultura per infissione tenuti a 37° è già completa per il tifo, il paratifo *A* e il b. Pantanello appena trascorse le 48 ore, mentre si compie non prima delle 72 ore per il paratifo *B*. Il *b. coli* anch'esso, non prima del terzo giorno, dà luogo a questo fenomeno di decolorazione, ma non in tutti i casi però, in quanto che pare che — non fosse altro — la rapidità con cui il fenomeno si compie sia legata alla qualità del terreno nutritivo.

Questa decolorazione si compie per riduzione della sostanza colorante, per la notata sovrapposizione cioè di due atomi di idrogeno alla sostanza stessa, sovrapposizione che ne fa un prodotto incoloro; cosa questa confermata dal fatto che fondendo i tubi di cultura e poi sbattendoli in modo da mettere la massa in intimo contatto con l'ossigeno atmosferico, il tubo di cultura si ricolora con quella tinta che è servita poi a stabilire la reazione assunta e che è stata segnata nella precedente tabella V.

Avrei dovuto quindi procedere allo studio comparato del potere di riduzione di questi germi di fronte ai colori di anilina; ma ho preferito prima completare le indagini dal punto di vista del loro potere fermentativo di fronte al lattosiero di Petruscky addizionato di laccamuffa, e di fronte ad un alcole esavalente, quale la mannite allestita in terreno nutritivo secondo la formula di Cappaldi e Proskauer, messa cioè di fronte al germe in esame in un terrenò con sostanza azotata assimilabile per il b. del tifo come il peptone, ad una sostanza azotata non assimilabile come l'asparagina.

Il saggio nel siero di latte alla laccamuffa (Lackmusmolke) di Petruschky permette, secondo Germano e Maurea (23), una netta distinzione fra tifo e tifosimili, anche per quei germi di quest'ultima categoria che su tutti gli altri terreni di nutrizione si sono comportati in modo del tutto analogo al b. del tifo. Perchè la prova, poi, in questi casi possa riuscire di grande

efficacia dimostrativa, tenendo conto della differente capacità di produrre acidi fra i due prototipi che starebbero ai due estremi della scala, il tifo (> 3 %) e il *b. coli* (7 %), bisogna dopo aver lasciato i tubi in cultura per 48 ore, aggiungere 1 volume di una soluzione $\frac{N}{100}$ di soda a 3 volumi di cultura: la cultura di tifo vira al violetto, la cultura di *b. coli* rimane rossa.

Procedendo in tal modo ho avuto i risultati che elenco nella tabella seguente:

TABELLA VI. — *Comportamento nei terreni nutritivi di Capaldi e di Petruschky.*

	Terreno nutritivo di Capaldi e Proskauer (cultura di 24 ore)		Lattosiero di Petruschky	
	I. - Mannite e asparagina	II. - Mannite e peptone	Aspetto delle culture dopo 24 h. di incubazione	Colore assunto dalle culture di 48 h. addizionate di soluzione $\frac{N}{100}$ di soda
Tifo laboratorio	Sviluppo non visibile; il terreno nutritivo resta di colorito violaceo	Sviluppo evidente; il terreno nutritivo è arrossato	Liquido limpido e senza notevole modificazione di colore	Vira dal roseo al viola carico.
Tifo Napoli	Come il precedente	Come il precedente	Come il precedente	Come il precedente.
Paratifo A	Come il tifo laboratorio . .	Sviluppo scarso; il terreno di nutrizione è leggermente arrossato	Come il tifo laboratorio . .	Come il tifo laboratorio.
Parutifo B	Sviluppo evidente; il terreno di nutrizione è arrossato	Sviluppo evidente, liquido scolorato, sbattendo la cultura, si arrossa	Liquido tordido, leggermente arrossato	Resta di colorito rosso.
B. Pantanello	Come il paratifo A	Sviluppo come il precedente; anche qui il liquido è scolorato; abbattuto, si colora in rosso.	Liquido limpido, senza notevole cambiamento di colore	Vira dal rosso al rosso cipolla (reazione neutra).
B. coli	Sviluppo evidente; il terreno di nutrizione è arrossato	Sviluppo evidente; liquido scolorato, che sbattuto si colora in rosso	Liquido torbido, nettamente arrossato	Resta di colorito rosso.

Sono quindi passato allo studio del potere riducente di questi germi in esame di fronte ad alcuni colori di anilina.

Non terrò singolarmente parola dei numerosi lavori riguardanti la capacità dei batteri in genere di ridurre e scolorare i colori di anilina, e per i quali gli svariati e spesso contraddittori risultati vanno imputati alla qualità del terreno nutritivo impiegato, quali il brodo, la gelatina, l'agar, e qualche volta alla qualità stessa del colore impiegato. In linea generale è da dire che alla buona riuscita delle ricerche è indispensabile premunirsi contro l'azione ossidante dell'aria la quale se in qualche caso, come per il bacillo dell'antrace avviene, può essere ipercompensata dall'attività riduttrice del germe in esame, può spesso sopravvanzare questa e falsare per ciò stesso i risultati dell'esperienza. Ottima pratica per tanto mi è parsa quella consigliata dal Wolff (24) e resa anche più alla mano, dopo la modifica fatta da Schneller al metodo di Rothbörger dalle recenti, dalle numerose osservazioni di Scarzella (25), alla quale ultima — salvo una variante di poco conto — mi sono attenuto. Speciale conto è poi ancora da tenere, come ho detto, della qualità della sostanza colorante: difatti, per citarne uno, il solfo indigotato sodico può essere scolorato oltre che per riduzione, anche per ossidazione (v. Wolff, l. c. p. 850), cosa che non permette quindi dire a scolorazione avvenuta del terreno di cultura, se essa dipende da proprietà ossidanti o riducenti del germe che si studia.

Tuttavia, ho io esperimentato anche su questa sostanza, che in questo genere di studi ha la sua importanza storica, come quella su cui fece cadere la sua osservazione Schottmüller, nelle sue prime ricerche batteriologiche comparative fra tifo, paratifo, e *b. coli* (V. *Zeitf. f. Hyg.*, vol. XXXVI, pagine 381 e seg.).

Le osservazioni da me fatte sono le seguenti:

TABELLA VII. — *Azione riducente su alcune sostanze coloranti.*

		B. tifo laboratorio	B. tifo Napoli	Paratifo *A*	Paratifo *B*	B. Pantanello	B. coli
Orceina	dopo 24 ore	+ + +	+ + +	+ +	—	+ +	—
	» 48 »	+ + +	+ + +	+ + +	+	+ + +	+
Nigrosina	» 24 »	—	—	—	—	—	—
	» 48 »	—	—	—	+	—	+ +
Uranina	» 24 »	—	—	—	—	—	—
	» 48 »	—	—	—	+	—	—
Verde di Metile	» 24 »	—	+	+ +	+ + +	+	+
	» 48 »	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ +	+ +
Rosso neutro	» 24 »	—	—	—	+	—	+
	» 48 »	—	—	—	+	—	+ + +
Solfo-indigotato di sodio	» 24 »	+	+	+ +	+	+	—
	» 48 »	+	+	+ + +	+	+ +	— (vira però al verde erba).

N.B. L'agar distribuito in quantità di 8 cm.^{3} per ogni tubo di cultura, veniva fuso; quindi tenuto a 45° veniva addizionato con $^1/_{10}$ - $^2/_{10}$ di cm.^{3} di soluzione sat. acquosa della sostanza colorante e infettato con un'ansa di brodo-cultura

Il segno — indica che la decolorazione manca; + che è appena sensibile al fondo del tubo di cultura; + + che si ha un anello colorato in superficie di qualche centimetro di spessore; + + + che resta solo un lieve anello colorato in superficie. Per il solo rosso neutro gli stessi segni indicano l'assenza o la intensità della fluorescenza verdastra.

Non si può quindi stabilire un criterio generale e dire se il bacillo del tifo ha un potere riducente maggiore o minore del *b. coli* o dei paratifi nelle sostanze coloranti; il giudizio invece va dato caso per caso, dipendendo l'assenza o la presenza di fenomeni di riduzione, e rispettivamente la loro maggiore o minore intensità, non solo dalla specie dei germi studiata. ma sopratutto dalla particolare affinità di questi germi medesimi con le singole sostanze coloranti.

Ho proseguito quindi le indagini paragonando la possibilità di sviluppo dei germi in quistione in brodo Parietti, e in brodo arsenicale (Brouardel e Thoinot); lo stesso ho fatto adoperando l'agar caffeinato di Roth (agar nutritivo ordinario con 50, 60, 70 per cento di soluzione acquosa 1 per cento di caffeina).

Nella tabella seguente elenco i risultati avuti indicando coi segni abituali (—, +, + +, + + +) l'assenza di sviluppo, o lo sviluppo tenue, o manifesto, o rigoglioso. I risultati vanno riferiti a culture di 48 ore, tenute sempre a 37°.

TABELLA VIII. — *Sviluppo in alcuni terreni speciali.*

		B. tifo laboratorio	B. tifo Napoli	B. paratifo *A*	B. paratifo *B*	B. Pantanello	B. coli
Agar caffeinato (Roth)	0,50 °/o	+ +	+ +	+ +	+ +	+	—
	0,60 °/o	+	+	—	+	—	—
	0,70 °/o	—	—	—	—	—	—
Brodo arsenicale (Brouardel e Thoinot)	1 cg. °/oo	+	+	+ +	+ + +	+ +	+ + +
	2 cg. °/oo	—	—	+	+	+	+ +
Brodo di Parietti .	primo	+	+	+	+	+	+ +
	secondo	+	+	+	+	+	+
	terzo	—	—	—	—	—	—

Come ultimo saggio in fine è stata eseguita la siero-reazione di Widal.

Degli animali sono stati immunizzati con culture uccise prima, poi con culture vive rispettivamente di *tifo laboratorio*, di *paratifo A*, *paratifo B*, di *bacillo Pantanello*, e dei singoli sieri è stato provato il potere agglutinante su tutti i germi in esame. La prova veniva eseguita praticando la diluizione voluta del siero in una soluzione 0.85 per cento di cloruro sodico, e stemperando quindi in 1 cmc. di essa una piccola quantità di batteri (patina di cultura su agar di 18 ore) fino a rendere il liquido opalescente; i saggi posti al termostato a 37° vi rimanevano per due ore e venivano osservati quindi uno per uno alla lente. Nella tabella che segue il segno + indica che la prova per l'agglutinamento è stata positiva, cioè che è stato possibile riconoscere manifestamente dei fiocchetti nella massa del liquido; il segno — indica che la prova è riuscita negativa.

TABELLA IX a). — *Potere agglutinante del siero-tifo laboratorio.*

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 600	1 : 800	1 : 1000
Tifo laboratorio. . . .	+	+	+	+	+	+	+	—
Tifo Napoli	+	+	+	+	+	—	—	—
Paratifo *A*	+	+	—	—	—	—	—	—
Paratifo *B*	+	—	—	—	—	—	—	—
B. Pantanello	+	+	—	—	—	—	—	—
B. coli	—	—	—	—	—	—	—	—

TABELLA IX b). — *Potere agglutinante del siero-paratifo* A.

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 600	1 : 800	1 : 1000
Tifo laboratorio. . . .	+	+	+	—	—	—	—	—
Tifo Napoli	+	—	—	—	—	—	—	—
Paratifo *A*	+	+	+	+	+	+	—	—
Paratifo *B*	+	+	+	—	—	—	—	—
B. Pantanello	+	+	+	+	+	+	+ (!)	—
B. coli	+	—	—	—	—	—	—	—

TABELLA IX c). — *Potere agglutinante del siero-paratifo* B.

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 600	1 : 800	1 : 1000
Tifo laboratorio . . .	+	—	—	—	—	—	—	—
Tifo Napoli	—	—	—	—	—	—	—	—
Paratifo *A*	—	—	—	—	—	—	—	—
Paratifo *B*	+	+	+	+	+	—	—	—
B. Pantanello . . .	+	—	—	—	—	—	—	—
B. coli	+	—	—	—	—	—	—	—

TABELLA IX d). — *Potere agglutinante del siero- b. Pantanello.*

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 600	1 : 800	1 : 1000
Tifo laboratorio . . .	+	+	+	—	—	—	—	—
Tifo Napoli	+	+	—	—	—	—	—	—
Paratifo *A*	+	+	+	+	+	+	—	—
Paratifo *B*	+	—	—	—	—	—	—	—
B. Pantanello . . .	+	+	+	+	+	+	+	—
B. coli	+	+	—	—	—	—	—	—

Ond'è che riassumendo, da quanto ho esposto risulta:

1° *a*) Non è costante il fatto osservato da Schottmüller e ripetuto dagli altri (Kayser, Neufeld, ecc.), che il b. paratifo *B*, coltivato a lungo nel latte lo rischiara fino a renderlo trasparente; a differenza però di quello che a parità di condizioni si osserva nelle culture dell'altro paratifo, del b. del tifo e del *b. coli*, dopo 15 giorni di incubazione la reazione del latte infettato con paratifo *B* è nettamente alcalina.

b) Nel caso della diagnosi batteriologica di un bacillo sospetto, limita la ricerca fra tifo e paratifi la prova di fermentazione sui disaccaridi; la prova della azione riducente sulla orceina, o il saggio sul latto-siero di Petruschky, o quello sui due terreni alla mannite di Capaldi e Proskauer possono far distinguere l'uno dall'altro i due tipi di paratifo *A* e *B*. Non si può però in ogni caso, a convalida della diagnosi fatta, rinunciare alla prova dell'agglutinamento.

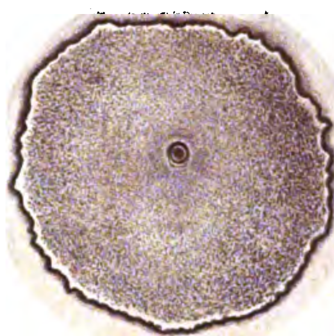
2° Il bacillo da me isolato dalle acque della sorgente Pantanello, per i suoi caratteri morfologici e culturali e per le sue proprietà biologiche si può a buon diritto identificare al b. paratifo tipo *A* (Brion-Kayser).

BIBLIOGRAFIA.

1. Achard e Bensaude. Bull. de la Soc. méd. des Hôpitaux de Paris, nov. 1896.
2. Widal e Nobécourt. Semaine médicale, 1897.
3. Gwyn. Johns Hopk. Hosp. Bull., 1898.
4. Cushing. Johns Hopk. Hosp. Bull., 1900.
5. Schottmüller. Deut. medic. Wochenschr., 1900, p. 511 e Zeits. f. Hygiene, 1901, vol. XXXVI, p. 368.
6. Kurth. Deut. med. Wochensch., 1901, n. 30-31.
7. Brion e Kayser. Muench. med. Wochensch., 1902, n. 15.
8. Basenau. Arch. f. Hygiene, vol. XXXII, 1898, p. 219.
9. Drigalsky. Festschr. z. sechszigsten Geburtstage v. R. Koch, 1903, p. 409.
9-*bis*. Conradi, Drigalsky e Jurgens. Zeit. f. Hygiene, vol. XLII.
10. De Feyfer e Kayser. Muench. medic. Wochenschrift, 1902, n. 41-42.
11. Stern. Sitzung d. med. Section d. Schlesischen Gesellsch. f. vaterl. Kultur, 12 dic. 1902.
12. Sion e Negel. Central. f. Bakter. Orig., vol. XXXII.
13. Hewlett. Amer. Journ. of med. Sc., 1902.
14. Brion. Deut. Klinik, 1903.
15. Bruns e Kayser. Zeits. f. Hygiene, 1903.
16. Colemann-Buxton. Amer. Jour. of med. Sc., 1902.
17. Allaria. Riforma medica, 1903, p. 1289.
18. Fischer. Festsch. z. sechszig. Geburtstage v. R. Koch, 1903. p. 271.
19. Drigalsky. L. c.
20. Ascoli G. Zeits. f. klin. Med., 1903, vol. 48.
21. Neufeld. In Kolle e Wassermann. Handb. d. path. Mikroorg., vol. II, p. 280, 1903.
22. Péré. An. d. l'Institut Pasteur, 1892.
23. Germano e Maurea. Ziegl. Beitr., vol. 12, p. 494, 1893.
24. Wolff. Central. f. Bakter. Orig., vol. XXVII, 1900, pag. 849.
25. Scarzella. Annali d'igiene sperim., 1904, fasc. 3°.



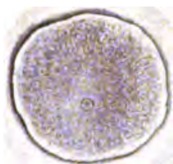
1.



2.



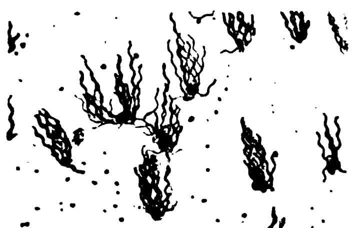
3.



4.



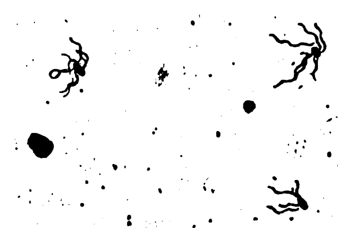
5.



6.



7.



8.



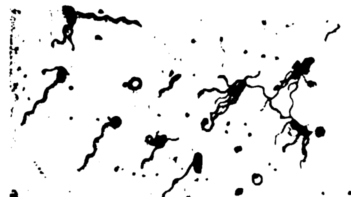
9.



10.



11.



12.

Istituto d'Igiene della R. Università di Pisa

Sui bacilli a colonia tifosimile

per il dottor **GINO DE' ROSSI**, aiuto.

(Con la Tavola III).

I.

Ragione del lavoro.

La comune abitudine di dar principio alle memorie scientifiche con una introduzione che ne esponga lo scopo e ne dimostri la opportunità, credo che ben di rado possa essere apparsa giustificata come nel caso presente. Invero lo studio dei microrganismi appartenenti al gruppo dei cosidetti tifo-e colisimili ha dato luogo a una serie così numerosa di pubblicazioni [ricordo fra le più importanti e aventi il carattere di veri studi sistematici quelle di Pellegrini (1), Orlowsky (2), Gilbert (3), Lembkes (4), Refik (5), Ehrenfest (6), Ford (7)] da sembrare ormai ben difficile il poter dire in proposito qualche cosa di nuovo e di utile; cosicchè non è senza una certa esitazione che, dopo un lavoro di più di tre anni, io mi son deciso ad aggiungere ancora un numero alla letteratura dell'argomento! Confesso però che tale esitazione non poteva che scomparire di fronte a ciò che si legge in proposito nei più recenti e importanti trattati di batteriologia. E non occorrerà mi dilunghi molto per dimostrare che ad onta del gran numero di lavori che negli ultimi anni si sono venuti pubblicando circa lo studio dei microrganismi a colonia tifosimile, pure l'argomento è a ritenersi tutt'altro che esaurito, tanto sono discordi le opinioni anche su punti fondamentali e apparentemente della massima semplicità.

Intanto, che cosa vuol dire la continua, affannosa, ingombrante descrizione di sempre nuovi metodi di studio differenziale tra il bacillo del tifo, il *b. coli* e i microrganismi simili, metodi spesso

morti prima di nascere e che nella grande maggioranza non costituiscono che inutili ripetizioni di altri già noti, se non che l'opinione scientifica non si è ancora sicuramente, incrollabilmente stabilita circa il valore dei caratteri differenziali dei microrganismi di questo gruppo?

E che significato probabilmente hanno certi pretesi anche recenti tentativi di trasformazione di una in un'altra specie batterica se non che l'imperfezione dei mezzi di ricerca e la incertezza della sistematica, che giustificano le erronee conclusioni cui giunsero in addietro anche valorosissimi studiosi, non sono ancora così sicuramente corrette da non potere anche oggi trarre in errore qualche osservatore?

Potrei continuare con analoghe considerazioni, ma mi contenterò di ricordare un dato di fatto, che dimostri qual grado, quasi incredibile, d'incertezza esista ancora intorno a un punto molto importante nello studio del gruppo di microrganismi che ci occupa; quello cioè della loro mobilità e della presenza di ciglia. E, poichè mi cade in acconcio, noto come giusto questa ricerca abbia costituito il punto di partenza del presente lavoro: solo in secondo tempo ho creduto opportuno di estenderlo e completarlo fino alle attuali proporzioni di uno studio generale sui microrganismi a colonia tifosimile. Fermiamoci dunque un momento sulla *questione apparentemente così semplice della mobilità e della presenza di ciglia* e, limitandoci al caso del *b. coli* vediamo senz'altro che cosa ci dicono i più recenti e autorevoli trattati di batteriologia.

***

MACÉ (8): Il *b. coli* è nettamente mobile. I movimenti sono in generale più lenti, meno vivaci di quelli del b. del tifo; sono per lo più movimenti di oscillazione in posto, quelli di traslazione diretta sono rari. La mobilità è dovuta alla presenza di ciglia vibratili... in numero di 4 a 6, eccezionalmente 8, disseminate su tutta la periferia dell'elemento; esse sono meno numerose, un po' più corte e più fragili che quelle del b. del tifo; nei preparati se ne vedono molte spezzate.

MIGULA (9): Il *b. coli* ha una mobilità variabile, per lo più minore di quella del b. del tifo; così pure il numero delle ciglia diffuse è oscillante ma di solito minore che nel tifo... Appartengono al *b. coli* solo le specie diffusamente cigliate, le forme con ciglia polari appartengono a un gruppo tutt'affatto diverso.

GUNTHER (10): Il *b. coli* possiede movimento proprio, che vien dato da ciglia vibratili le quali aderiscono ad uno degli estremi della cellula: per lo più ogni cellula possiede un ciglio, talvolta però si vedono attaccate ad una cellula anche più ciglia.

Casagrandi, nel manuale di Celli (11): Il *b. coli* generalmente è immobile, però secondo la maggioranza degli A.A. sarebbe provvisto di ciglia (peritrico e a volte lofotrico) (pag. 396). Invece a pag. 230, lo si pone (con ?...) fra i monotrichi.

Besson (12): Il *b. coli* è in generale meno mobile del b. del tifo, la mobilità è del resto assai variabile per bacilli di provenienza diversa: certe forme sono immobili, in altre i movimenti sono poco estesi, infine certe varietà hanno una mobilità simile a quella del b. del tifo. Le ciglia del *b. coli* non rassomigliano che assai lontanamente a quelle del b. di Eberth: si colorano cogli stessi metodi, ma l'operazione è di più difficile riuscita... Non si contano che da 4 a 6 flagelli per bacillo, la cifra di 12 è assolutamente eccezionale. Le ciglia possono impiantarsi su tutta la superficie del bacillo: più sovente sono disposte in 1 o 2 fiocchetti inseriti su di un punto qualunque del corpo del bacillo (?), ma di preferenza a un estremo. Sono da due a tre volte meno lunghe dei flagelli del tifo, la loro lunghezza non sorpassa guari 3–5 μ, sono anche meno flessuose, meno ondulate, ecc.

Pfaundler nell'Handbuch di Kolle e Wassermann (13): Circa la mobilità del *b. coli* si hanno opinioni molto contraddittorie... Si ha una forma di movimento attivo che deve chiaramente distinguersi dal movimento molecolare browniano che solo appartiene al *b. coli* secondo Tavel, C. Fraenkel, Rossi Doria. La mobilità, sebbene in generale molto limitata, del *b. coli* può però ritenersi come un carattere costante della specie che può servire alla differenziazione da altre specie. Il *b. coli* deve la sua attitudine alla locomozione attiva su substrati liquidi alla presenza di ciglia... Questa ricerca presenta considerevoli difficoltà di tecnica. Mentre Löffler, Ferrati, Dunbar e altri, hanno potuto mettere in evidenza nel *b. coli* numerose ciglia lunghe e ondulate, simili a quelle del b. del tifo, dalla maggior parte degli altri ricercatori (Chantemesse e Widal, Luksch, Remy e Sugg, Nicolle e Morax, Losener, Klemensiewicz), il numero delle ciglia viene stimato a 2-3 o al più 4-8. Anche recentissimamente si sono avuti risultati molto diversi. Hinterberger col metodo di v. Ermengem, mise in evidenza numerose ciglia; Peppler nel suo esame di 26 stipiti di *b. coli* dall'intestino umano ne trovò solo 5 ciliati (con 1-8 ciglia al più, solo una volta 2-6) tutti gli altri erano assolutamente privi di ciglia. Le ciglia del *b. coli* sono di solito più corte e più grosse di quelle del b. del tifo, sono impiantate piuttosto all'estremità che ai lati e derivano da una capsula difficilmente colorabile, dello stesso materiale. Lehmann pone il *b. coli* fra i microbi peritrichi e separa dal gruppo principale le forme con poche ciglia polari (che sono la regola secondo Fremlin) come uno speciale tipo « *b. coli forma polaris* ». Stocklin su 300 esemplari di *b. coli* isolati dalle feci normali di adulti sani ne trovò solo 116 mobili, gli altri 184 (61 °/₀) completamente immobili. Nella prima categoria si trovavano peritrichi, monotrichi e lofotrichi: il numero delle ciglia oscillava tra 1 e 8.

Spero mi si voglia perdonare l'estensione data a queste citazioni, vista la stranezza della conclusione che ne deriva: che cioè attualmente, dopo che sul *b. coli* si è scritto tanto, non si è con certezza stabilito se esso debba considerarsi *immobile o dotato di lento movi-*

mento o talvolta mobile anche come il b. del tifo; se si presenta sprovvisto di ciglia, o con un ciglio polare, o con ciuffi di ciglia impiantati a un estremo o lateralmente sul corpo del bacillo, o addirittura peritrico; se le sue ciglia per numero e forma differiscono molto o sono pressochè uguali a quelle del tifo!

Vedremo fra breve, come l'osservazione scrupolosa di alcune semplicissime norme di tecnica nell'osservazione dei microrganismi viventi, e nella colorazione delle ciglia, permette di ridurre a grandissima semplicità e sicurezza di risultato, tutta cotesta oscura congerie di opinioni contraddittorie: ma intanto, se si pensa che del gruppo dei microrganismi da me presi in considerazione, il *b. coli* è, insieme col b. del tifo, quello che certamente è stato più studiato, mi sembra che debba ritenersi come superflua ogni ulteriore giustificazione del presente lavoro. Nel quale io pertanto mi sono proposto di studiare un numero molto notevole di quei bacilli, che in cultura su piastra di gelatina presentano colonie simili o molto vicine a quelle del b. del tifo, cercando, in base ai più sicuri metodi di indagine culturale, messi a confronto con lo studio morfologico e sierodiagnostico, di stabilirne nel modo più semplice ed esatto la diagnosi differenziale, definendo le caratteristiche essenziali per mezzo delle quali le singole specie possono sicuramente individualizzarsi.

II.

Concetto del cosiddetto gruppo dei tifosimili.

È evidente che le espressioni: gruppo dei tifosimili, dei colisimili, nonchè quelle più moderne di paratifi e paracoli non possono accettarsi se non come diciture convenzionali di pura comodità, dappoichè il semplice fatto della rassomiglianza della colonia in gelatina non ci autorizza menomamente a riunire questi microrganismi in un gruppo naturale e tanto meno ad attribuir loro una stretta parentela col b. del tifo o col *bacterium coli*, la quale esiste certo per alcuni di essi, ma non ci è lecito di estendere a tutti. A scanso di erronee interpretazioni io credo dunque molto preferibile la espressione che costituisce il titolo di questo lavoro: *bacilli a colonia tifosimile.*

Ciò premesso, è di somma importanza stabilire con molta precisione il concetto di questa colonia tifosimile, perchè la inesatta

interpretazione di esso è una delle cause della confusione esistente nell'argomento, come quando si includono nel cosiddetto gruppo dei tifosimili microrganismi a colonie pigmentate, fluorescenti o conformate in modo troppo diverso da quella del b. del tifo. La cosa risulta chiarissima se la si considera da un punto di vista pratico. Astrazion facendo dai fini della pura sistematica batteriologica, qual'è lo scopo di questi studi sui batteri tifo - e colisimili se non la sicura agevole differenziazione del b. del tifo e del *b. coli* da tutte le altre specie più o meno vicine, assai diffuse in natura, e che nella gelatina, il mezzo di isolamento comunemente adottato, presentano colonie difficilmente differenziabili da quelle dei due microrganismi ricordati? Dunque *i limiti del nostro studio sono nettamente definiti in rapporto con quei bacilli, le cui colonie in gelatina, e più specialmente le colonie superficiali, le sole che abbiano un aspetto veramente tipico, si presentano uguali o molto simili a quelle del tifo.*

Com'è noto, in gelatina al 10 per cento, leggermente alcalina (della cui preparazione diremo tra poco), il b. del tifo e il *b. coli* presentano colonie caratteristiche e molto rassomiglianti, la principale differenza consistendo nell'assai maggiore rapidità di sviluppo di quelle del *b. coli.* Dopo 24–48 ore di incubazione a 18°-20° cominciano ad apparire dei punticini bianchi, che a piccolo ingrandimento si mostrano trasparenti, incolori o leggermente gialletti, finamente granulosi, rotondi, a margini netti. In progresso di tempo le colonie che sviluppano negli strati profondi della gelatina, pure aumentando di dimensioni e colorandosi più intensamente in giallo, mantengono lo stesso aspetto poco caratteristico. Le colonie superficiali invece divengono assolutamente tipiche: macroscopicamente appaiono bianche, sottili, irregolarmente circolari o poligonali, a contorni frastagliati, incisi; all'esame microscopico sono incolore o leggermente gialliccie, finamente granulose, con o senza una piccola rilevatezza centrale o eccentrica, con margini finissimi, ialini, trasparenti, irregolari, con superficie solcata da linee irregolari, ramificate, intersecantisi, paragonate molto giustamente alle circonvoluzioni della massa dell'intestino tenue o della superficie cerebrale. (cfr. figg. 1 e 2).

Ma è noto del pari che, oltre a queste forme tipiche il *b. coli* spesso ed eccezionalmente anche il b. del tifo, indipendentemente dalla natura del mezzo nutritivo, possono dar luogo a colonie di aspetto un po' differente, specialmente all'esame microscopico. Anche le colonie superficiali, cioè, possono essere di forma assai più regolarmente tondeggiante, a margini pressochè netti: microscopica-

mente si presentano assai più opache, di colorito gialletto anche assai intenso, con rilevatura centrale o eccentrica di colorito spesso assai oscuro, senza o con lievi traccie della solcatura caratteristica, ma con superficie più o meno grossolanamente granulosa o screpolata e talvolta con solchi irradianti dalla rilevatura centrale (cfr. figg. 5, 6, 7).

A questi due tipi dobbiamo dunque esclusivamente riferirci, beninteso quando si tratti di culture di isolamento fatte secondo le norme opportune di tecnica, con gelatina di normale composizione (a titolo non superiore del 10 per cento!) e tenute in convenienti condizioni fisiche; dovendosi in tal caso escludere anche tutte le forme a rosetta, a margherita, a salsicciotto, filamentose, ramificate, piumate, che appartengono ad altre specie batteriche, ma che per imperfezioni o trascuranze di tecnica (gelatina troppo densa, di reazione acida o troppo alcalina, soggetta a fusione durante il periodo di incubazione, seminata troppo abbondantemente o con materiale inadatto, ecc.), possono essere assunte anche dai microrganismi a colonia tifosimile, dando luogo a gravissima confusione che toglie ogni possibilità di orientamento. Non è dunque superfluo esporre brevemente queste norme da me scrupolosamente seguite in tutto il corso del lavoro.

La gelatina veniva preparata (in quantità assai notevole, parecchi litri ogni volta, per ottenere la massima possibile costanza di composizione) mescolando in grossi palloni di vetro i vari ingredienti nelle seguenti proporzioni:

Acqua distillata 1 litro. Estratto di carne Liebig 10 gr. Peptone Witte 10 gr. Cloruro di sodio 5 gr. Gelatina di 1ª qualità 100 gr. Il miscuglio veniva tenuto per 30′ a 100° nella pentola di Koch, quindi vi si aggiungeva a poco a poco della soluzione satura di carbonato di soda, saggiando la reazione con cartine di tornasole Merck, fino ad aversi reazione neutra o anfotera; allora per ogni litro di gelatina si aggiungeva 1 cmc. di soluzione alcalina e un bianco d'uovo sbattuto, agitando molto energicamente. I palloni venivano di nuovo tenuti per 1 ora precisa a 100° nella pentola di Koch, dopo di che la gelatina che appariva già ben chiarificata veniva filtrata nell'apposito imbuto riscaldato e distribuita in provette o in palloni che si sottoponevano a sterilizzazione frazionata. Dopo la terza sterilizzazione i palloni venivano chiusi ermeticamente con ceralacca e serbati in luogo fresco e all'oscuro, avendosi così la perfetta conservazione della gelatina anche per un periodo assai lungo di tempo.

Le culture d'isolamento si facevano o da liquidi o da materiali solidi accuratamente e omogeneamente spappolati in acqua sterile, o da culture in brodo recenti; e se ne facevano sempre 3 o 4 con quantità molto differenti di materiale onde poter poi utilizzare quella in cui le singole colonie appa-

rivano sufficientemente distanziate in modo da non disturbarsi reciprocamente nel loro sviluppo.

Così ho fatto, dal 1900 in poi, un numero grandissimo (molte centinaia!) di culture di isolamento dai mezzi più diversi che si presumono poter contenere o il bacillo del tifo, o il *b. coli*, o gli altri tanto diffusi microrganismi a colonia tifosimile, e cioè:

Acqua di fonte, di pozzo, di cisterna, di fiume, di sorgente, distillata;

Acque minerali da tavola e purgative;

Feci di uomini sani e ammalati e di animali (cavia, coniglio, cane, bue, ecc.);

Contenuto intestinale di cadaveri di uomini, morti per le più diverse malattie, e di animali sani e ammalati;

Acqua, latte, orine, ecc.

Le colonie che, dopo un periodo di incubazione di 2 a 6-7 giorni, presentavano aspetto tifosimile tipico o atipico, venivano trapiantate in provette di brodo comune che si mettevano nel termostato a 37°. Così si potevano subito eliminare i microrganismi che a questa temperatura non si sviluppano, dopodichè l'esame in goccia pendente permetteva già di scartare un numero abbastanza notevole di esemplari, e cioè le forme di cocchi (non rare) e di grossi bacilli (superiori a 4×1 μ) a riguardo delle quali la differenziazione ulteriore dal bacillo del tifo, dal *b. coli* e simili, era perfettamente superflua.

Così pure si scartavano senz'altro quei microrganismi che non intorbidavano uniformemente il brodo, ma davano luogo solo a formazione di pellicola superficiale, quelli sporiferi e quelli che davano risultato positivo sottoposti alla colorazione col metodo di Gram.

Rimane dunque stabilito che i microrganismi studiati presentano una serie di caratteri fondamentali che individualizzano il cosiddetto gruppo dei tifosimili, e che possono così riassumersi: *Bacilli mobili o immobili, di dimensioni (nei singoli individui) non superiori a* 4×1 μ, *che sviluppano a temperatura di 37°, aerobi facoltativi, che intorbidano uniformemente il brodo, non sporigeni, non colorabili col metodo di Gram, con colonia tifosimile (tipica o atipica) su gelatina normale.*

III.

Mezzi di studio e di classificazione dei bacilli a colonia tifosimile.

Nel modo descritto ho isolato in cultura pura 123 microrganismi che in tempi successivi, dal 1900 ad ora, ma sempre comparativamente, e ripetutamente, ho studiato nei più importanti caratteri morfologici, biologici e culturali che vado ad esporre. E ripeto quanto ho detto più sopra, che cioè la descrizione della tecnica

seguìta, nelle più ovvie e minute particolarità, non deve ritenersi superflua, dappoichè io sono intimamente convinto che la causa precipua della confusione esistente nell'argomento che ci occupa è specialmente da ricercarsi in difetti e sopratutto in diversità apparentemente piccole, ma sostanziali, della tecnica seguìta dai vari autori.

Le ricerche praticate sono dunque le seguenti:

a) Cultura d'isolamento su gelatina in scatola di Petri.

Si preparava dalla cultura pura in brodo, di 24 ore, colla tecnica abituale dei passaggi successivi in tre tubi di gelatina normale al 10 per cento, preparata nel modo descritto nel precedente capitolo. Le culture, nei mesi caldi, si facevano rapidamente solidificare per mezzo del ghiaccio; di poi, chiuse in camere umide di Tyndall, erano tenute all'oscuro, nel termostato o nella ghiacciaia, a una temperatura che di regola oscillava tra 18° e 20° e solo eccezionalmente raggiunse i limiti più estesi di 16° e 21°. Lo sviluppo delle colonie veniva osservato ogni 24 ore, ma di regola si teneva conto del loro aspetto al 4° giorno di sviluppo, quale si presentava nella piastra in cui le colonie apparivano sufficientemente distanziate. L'esame microscopico si faceva a un ingrandimento di 20-30 diametri. Per le riproduzioni microfotografiche si veda la nota in fine del lavoro.

b) Cultura pura in brodo: morfologia e mobilità dei microrganismi.

Il brodo veniva così preparato, ogni volta in grande quantità: Acqua distillata gr. 1000. Estratto di carne Liebig gr. 10. Peptone Witte gr. 10. Cloruro di sodio gr. 5. Si teneva il miscuglio per 30′ a 100° nella pentola di Koch, quindi si alcalinizzava con lo stesso sistema tenuto per la gelatina, si teneva ancora per 2 ore nella pentola di Koch, si filtrava e si distribuiva nelle provette e nei palloni che dopo sterilizzati si chiudevano con ceralacca e si conservavano in luogo fresco ed oscuro.

I tubi di brodo venivano innestati col materiale di una colonia in gelatina superficiale, facendosi sempre contemporaneamente due culture, delle quali una si teneva a temperatura di 18°-20°, l'altra a 37°, e che si esaminavano in goccia pendente, per lo studio della morfologia e specialmente della mobilità dei microrganismi, non appena si osservava una traccia lievissima di intorbidamento, e cioè di regola dopo 4-8 ore di incubazione per le culture a 37°, dopo 18-24 per le culture a 18°-20°. L'esame poi si ripeteva dopo 24 e 48 ore di incubazione.

La scrupolosa osservanza di tali norme mi ha permesso di orizzontarmi molto bene in modo da evitare inesattezze ed errori in cui caddero a questo riguardo moltissimi autori. Così è noto che

la composizione del brodo e la sua reazione [Terni (14), Remy e Sugg (15), Matzuschita (16)] hanno già un'influenza molto notevole sul grado e sul modo di manifestarsi della mobilità dei batteri, e in ispecial modo di quelli di cui ci occupiamo: è noto altresì che alcuni di questi o non sviluppano o sviluppano molto stentatamente a temperatura di 37°, mentre altri solo a questa temperatura elevata trovano favorevoli condizioni di esistenza. Ma specialissima importanza, per lo studio della mobilità, hanno le accennate prescrizioni di eseguire sempre due culture a temperatura bassa e alta e di *farne l'esame in goccia pendente nei primissimi stadi di sviluppo*, per le seguenti considerazioni risultanti da dati di fatto da me ripetutamente constatati:

1. Esistono nel gruppo dei microrganismi a colonia tifosimile varie specie, le quali coltivate a temperatura di 37° si mostrano pressochè immobili o leggermente e irregolarmente mobili, mentre assumono una vivacissima tipica mobilità nelle culture a temperatura non superiore a 20°.

2. Nella grande maggioranza dei microrganismi mobili, e specialmente in quelli del gruppo del b. del tifo e del *b. coli*, la mobilità tipica si osserva solo nelle culture in stadio iniziale di sviluppo. Nelle culture ormai abbondanti, anche se relativamente recenti, molto spesso la mobilità è notevolmente diminuita. Questo è un fatto che, per esempio, si verifica quasi costantemente per il tipico *b. coli*, il quale negli inizialissimi stadi di sviluppo della cultura presenta una mobilità molto simile a quella del tifo, ma che con rapidità grandissima, molto maggiore che non avvenga per il tifo e per altri microrganismi del gruppo, si modifica e diminuisce.

Il fatto che basta l'indugio di una o poche ore nella osservazione in goccia pendente delle culture a 37°, perchè il movimento tipico di una cultura di b. coli, pressochè uguale a quello del tifo, si riduca notevolmente, presentando le modificazioni che in generale si descrivono come caratteristiche del b. coli, fino ad abolirsi quasi completamente in meno di 24 ore, specie negli esemplari a sviluppo molto rigoglioso, permette di spiegare chiaramente la contraddizione esistente nelle osservazioni dei vari AA. su questo punto. Tale causa di errore e di confusione si rimuove facilmente sorvegliando accuratamente le culture a 37°, in modo da poter fare l'esame in goccia pendente non appena si osserva una traccia appena percettibile di intorbidamento, e meglio ancora osservando le culture sviluppate a 18°-20°, nelle quali lo sviluppo è così rallentato, che qualche ora di ritardo non porta modificazioni apprezzabili, mentre d'altro lato la bassa temperatura

non è di alcun danno, essendo anzi favorevolissima al movimento di tutti i microrganismi, compresi quelli del tifo, che tenuti a temperatura di 5°-6° e anche inferiore, si mantengono tipicamente mobili per lunghissimo spazio di tempo.

Del resto, per meglio orientarsi sui caratteri della mobilità dei batteri in genere, e dei tifosimili in specie, noi possiamo stabilire alcuni tipi che l'osservazione accurata, in buone condizioni, permette di distinguere nettamente: Abbiamo un primo tipo di *movimento brusco, a scatti, ma regolare, senza apparenti rivolgimenti intorno agli assi minori del corpo*, rapido così, che i bacilli attraversano il campo del microscopio con velocità tale che spesso è impossibile seguirli coll'occhio, ed alternato, di solito, con periodi di riposo.

Un secondo tipo comprende i microrganismi che si muovono pure *a scatti, con bruschi guizzi, ma meno rapidi e meno estesi dei precedenti e con evidenti rivolgimenti intorno a tutti gli assi del corpo.*

A un terzo tipo appartiene la mobilità caratteristica del b. del tifo (ma che è propria di molti altri, e anche, negli stadi iniziali di sviluppo, del *b. coli*) e cioè una *progressione piuttosto veloce, continua, ordinata, con brevi ondulazioni e vibrazioni laterali, talvolta con moto serpeggiante, ma senza mai rivolgimenti dell'asse maggiore:* i microrganismi, sull'orlo della goccia pendente, per la regolarità e la continuità del movimento, ricordano [secondo l'espressione del Di Vestea (17)], « il *brulichìo di un formicaio* ». Da questo si passa, con successive gradazioni, a un quarto tipo, nel quale, accanto a microrganismi più o meno immobili, se ne osservano altri dotati di *movimenti disordinati, direi quasi incoordinati, con continui rivolgimenti e cambiamenti di direzione.* Questo tipo, erroneamente ritenuto come caratteristico di molte forme di *b. coli*, non rappresenta, secondo le mie osservazioni, che una modificazione del tipo precedente, che si verifica dopo un periodo di tempo molto vario per i diversi microrganismi (e specialmente breve per il *b. coli*, data la sua grande rapidità di sviluppo) fino a raggiungere la massima riduzione del movimento, limitato, a stadi avanzati di sviluppo, a brevi oscillazioni laterali e rivolgimenti senza vera locomozione; una condizione cioè, simile al cosiddetto movimento browniano o molecolare, che pure è proprio di molti tifosimili, ma che non può assolutamente considerarsi come un movimento attivo e non è in rapporto con la presenza di ciglia. Ed appunto è della massima importanza evitare la facile confusione che tra questo *movimento molecolare* e il movimento ridotto potrebbe sorgere quando si

esaminassero culture non recenti; l'osservazione invece di culture in stadio inizialissimo di sviluppo, ci garantisce contro questa causa di errore, permettendoci sempre di differenziare colla massima facilità il movimento molecolare dalla vera locomozione attiva che — in queste condizioni — si accosta sempre ad uno dei primi tre tipi descritti.

Accennerò qui subito come *questi tre tipi fondamentali di movimento sono in stretta dipendenza dalla disposizione delle ciglia, corrispondendo il primo ai microrganismi lofotrichi, il secondo ai monotrichi, il terzo ai peritrichi. In quest'ultimo poi la graduale diminuzione delle ciglia va di pari passo con i descritti mutamenti del carattere della locomozione.*

Avrò occasione di dire più oltre della costanza di tutti i caratteri morfologici e culturali dei microrganismi da me studiati nel corso di 4 e più anni, ma voglio subito accennare al fatto assai importante e che contraddice ad affermazioni di altri autori, che cioè avendo ripetuta recentemente la osservazione della mobilità già fatta subito dopo l'isolamento di ciascun bacillo, mantenendo costante la composizione del brodo, la temperatura di sviluppo, ecc., *nessuna apprezzabile modificazione ho potuto osservare essersi verificata nella mobilità di nessuno dei microrganismi trapiantati sui mezzi artificiali di cultura per così lungo periodo di tempo.*

c) Colorazione delle ciglia.

È stata eseguita col mio metodo descritto in precedenti memorie (18), (19), (20), seguendo la tecnica specialmente descritta nella seconda per la colorazione e gli avvedimenti esposti nella terza per ciò che riguarda la preparazione del materiale di cultura. Sul primo punto stimo inutile ritornare se non per confermare che l'applicazione pratica fatta, passando in rassegna un così largo numero di microrganismi, mi permette di ripetere quanto altra volta dissi circa la sua *assoluta sicurezza di risultato. dovuta essenzialmente al fatto della sua graduabilità, in rapporto con la facile variabilità delle sostanze coloranti e con la diversa suscettibilità delle ciglia alla loro azione.* Ma voglio insistere un momento sul secondo punto, e cioè circa la preparazione delle culture che devono fornire il materiale da colorarsi. Queste, come è noto, si fanno, di solito, per strisciamento in agar solidificato di fresco a becco di flauto. Per le ragioni esposte, a proposito dello studio della mobilità, ed essendo noto che mobilità e presenza di ciglia sono due termini assolutamente correlativi, è evidente che un buon risultato può ottenersi solo da culture recentissime, e specialmente se fatte sviluppare a bassa temperatura. Di più una lunghissima esperienza avendomi convinto che la dimostrazione delle ciglia riesce tanto migliore quanto più

umida è la superficie dell'agar (*), io ho tenuto per la preparazione delle culture la seguente tecnica che mi ha dato risultati di gran lunga superiori a quelli ottenuti dalle semplici culture per strisciamento, permettendomi, per esempio, di riconoscere la presenza di numerose e belle ciglia in vari esemplari di *b. coli*, che altrimenti, per quanto ripetessi la ricerca, se ne mantenevano poverissimi o privi del tutto.

Si versa dell'agar sterile, fuso, in una scatola di Petri: dopo solidificato si fa cadere sulla sua superficie, con una pipettina, una piccola goccia di acqua distillata sterile nella quale si diluisce una traccia di materiale batterico (una piccola ansa di altra cultura in agar).

La capsula viene poi tenuta nell'incubatrice a 18°-20°: in capo a un intervallo di tempo assai variabile per i diversi microrganismi (10-24 e più ore) si può osservare una lieve patina umidissima, sviluppatasi essenzialmente a spese delle traccie di sostanza dell'agar disciolte dalla gocciolina d'acqua, che all'esame in goccia pendente, quando trattasi di specie dotata di locomozione attiva, si mostra formata di microrganismi mobilissimi, e che costituisce, opportunamente diluita, un ottimo materiale per la colorazione delle ciglia.

In alcuni casi anche dalle comuni culture in agar a 37°, purchè assai recenti, si possono avere buonissimi preparati di ciglia; ma considerando che in altri (per esempio, in molti esemplari di *b. coli*) solo seguendo la tecnica descritta si otteneva risultato sicuro e costante, e in altri ancora (analogamente a quanto ho detto a proposito della mobilità) lo sviluppo delle ciglia sembrava verificarsi quasi esclusivamente a temperatura di 18°-20°, e considerando altresì che in genere per tutti gli esemplari l'umidità del mezzo di cultura e la bassa temperatura di sviluppo erano piuttosto di vantaggio che di danno, così nella preparazione del materiale io ho sempre seguito e consiglio di seguire il metodo accennato delle culture a bassa temperatura su piastra d'agar inumidita.

Dell'aspetto, numero e disposizione delle ciglia dirò descrivendo le varie specie batteriche; per la descrizione delle microfotografie si veda la nota in fine del lavoro. Qui espongo solo due considerazioni di ordine generale:

1° *Nulla autorizza ad accettare l'opinione di alcuni AA. che le ciglia si stacchino da una capsula involgente i microrganismi: intorno a questi spesso si osserva un alone ma che dipende manifestamente o da precipitazione della sostanza colorante, o da disfacimento delle ciglia* (**).

(*) Questa mia osservazione, già esposta in una precedente memoria (20), è stata ampiamente confermata da Hinterberger (Centralblatt f. Bakt., Orig., 17 ottobre 1904, p. 481).

(**) Per varie considerazioni (non ultima quella della caratteristica forma a spirale) e come conseguenza delle mie ricerche sui fenomeni dell'agglutinazione dei batteri già pubblicate (29) e da pubblicarsi, io sono indotto a considerare le ciglia come prolungamenti del protoplasma batterico.

2° *Il numero, la forma, le dimensioni delle ciglia sono fino a un certo punto influenzati dalla natura del mezzo nutritivo, dalla temperatura di sviluppo, dall'età della cultura, dalla tecnica seguita nella colorazione, ecc., ma a parità di condizioni e con tecnica rigorosamente esatta, esse mostrano, anche a distanza di anni, un'assoluta invariabilità.*

d) Cultura in brodo glucosato.

Il brodo comune, preparato nel modo indicato, e addizionato del 3 °/₀ di glucosio purissimo, veniva distribuito negli appositi tubi ad U alla Smith che si sottoponevano a sterilizzazione frazionata. L'innesto era fatto sulla superficie del brodo, e i tubi, senza agitarli, erano posti nella stufa a 37°, in posizione perfettamente verticale. In caso di mancato sviluppo si ripeteva la cultura, tenendola a temperatura di 18°-20°. Le culture si osservavano dopo 24 ore, e poi ripetutamente nei giorni successivi, tenendo conto se si aveva intorbidamento generale, o solo nel ramo aperto del tubo ad U, e soprattutto se si verificava sviluppo di gas e con quale energia.

e) Reazione dell'indolo.

Si saggiava sulle culture in brodo comune dopo 5 giorni di dimora a 37° col semplice e ottimo metodo di Crisafulli (21). Nella cultura si deponeva una sottile scheggia di legno di pino, si aggiungevano 10 goccie di acido cloridrico concentrato purissimo: la colorazione rossa più o meno intensa della scheggia di legno che avviene o rapidamente o dopo varie ore, testifica la presenza dell'indolo. Io ho osservato che riscaldando il liquido fin presso all'ebollizione la reazione positiva si ha molto più rapidamente, in pochi minuti. In ogni modo, sempre che ottenevo risultato negativo, ripetevo più volte la ricerca tenendo in osservazione la cultura per 24 ore e più.

f) Culture in latte.

Latte puro appena munto, veniva distribuito in provette e sterilizzato nella pentola di Koch per tre quarti d'ora e per tre giorni di seguito. Le culture erano tenute nel termostato a 37°, osservate dopo 24 ore e poi ad intervalli di 24 ore per 8 giorni; potendo la coagulazione avvenire anche dopo un periodo assai lungo di tempo. Quando il latte, dopo 8 giorni, si manteneva intatto, eseguivo un passaggio di controllo in brodo per accertarmi dell'avvenuto sviluppo. È superfluo il ricordare che è necessario tener presente la differenza tra la vera e propria coagulazione del latte con separazione di siero limpido, e altre modificazioni come il semplice rapprendimento o la cosiddetta peptonificazione, ecc., che avvengono per opera di alcuni microrganismi.

g) Liquidi di Capaldi e Proskauer (22).

Sono due mezzi culturali per la diagnosi differenziale fra il b. del tifo e il *b. coli* veramente raccomandabili e di cui l'uso non è così diffuso come meriterebbero.

Uno di essi ch'io designerò come I si compone di: acqua distillata 1000, asparagina 2, mannite 2, cloruro di sodio 0.20, solfato di magnesia 0.10, cloruro di calcio 0.20, fosfato monobasico di potassa 2. Si sterilizza per un'ora e mezzo nella pentola di Koch, si alcalinizza leggermente con carbonato di soda, si aggiunge tintura di tornasole e si distribuisce nei tubi. In questo mezzo di cultura il bacillo del tifo non si sviluppa, mentre il *b. coli* dopo un soggiorno di qualche ora a 37° dà luogo a una marcata colorazione rosea dovuta agli acidi prodotti dalla decomposizione della mannite.

L'altro liquido, che indico come II, contiene: acqua distillata 1000, peptone Witte 20, mannite 1. Si sterilizza, si neutralizza con acido citrico e si distribuisce nei tubi. In questo liquido il bacillo del tifo sviluppa bene e attacca la mannite dando luogo a una colorazione rosea spiccata, mentre il *b. coli* produce invece corpi basici e dà colorazione azzurra.

Questi due mezzi di cultura danno indicazioni utilissime e sicure; ma è necessario sorvegliare molto accuratamente lo sviluppo delle culture, inquantochè le ricordate modificazioni di colore che si verificano più o meno sollecitamente (12-36 ore di stufa a 37°) a seconda della maggiore o minore rapidità di sviluppo delle varie specie batteriche, in secondo tempo subiscono notevoli modificazioni da cui si sarebbe del tutto disorientati. Così, per esempio, in molti casi la colorazione rosea che alcuni microrganismi impartiscono al liquido I, dopo 2-3 giorni si muta in azzurra, e spesso il liquido II, dopo resosi azzurro per opera del *b. coli*, in progresso di tempo può farsi del tutto incoloro. Tali incertezze sono però sicuramente evitate esaminando le culture dopo 12-24 ore.

***

Questi sono i pochi mezzi di studio e di diagnosi che io ho ritenuto sufficienti per stabilire la propostami classificazione dei 123 esemplari isolati.

Potrà destar meraviglia che io non abbia tenuto conto di nessuno degli altri numerosissimi metodi di diagnosi culturale; ma questa trascuranza non è che apparente ed è conseguenza invece di un lungo e paziente studio che ho fatto di molti di essi e che mi induce a distinguerli tutti quanti in due categorie: gli infidi e i superflui.

Alla prima categoria, di quelli che non garantiscono la assoluta costanza di risultato che è necessaria per potersi orizzontare nell'intricato argomento, appartiene per opinione ormai comune la cultura su patata, dipendentemente dal fatto ovvio e praticamente inevitabile della notevole instabilità di composizione chimica di questo terreno, ed io ho ripetutamente constatato un medesimo esemplare di b. del tifo dare ora la caratteristica cultura invisibile, ora un'abbondante patina, e uno stesso *b. coli* dare una patina ora scarsa, bianchiccia, ora abbondante, gialletta o scura, ecc. E, per citare un altro esempio, anche l'agar alla Wurtz (con lattosio e tornasole) che pure è uno dei mezzi più comunemente adottati per la diagnosi differenziale tra il b. del tifo e il *b. coli*, in più di un caso seminato in tempi diversi con un medesimo microrganismo mi ha dato risultati contradditori.

Fra gli altri metodi poi, che io ho chiamato superflui, ve ne sono alcuni in realtà buonissimi e perfettamente corrispondenti allo scopo, quali il brodo lattofenolftaleinico di Abba (23), il brodo epatico di Cesaris-Demel (24), l'agar di Drigalski e Conradi (25). Anzi, io ho largamente applicati questi tre metodi, ma ho ritenuto perfettamente inutile tener conto di essi nell'esposizione dei risultati delle mie ricerche, inquantochè, mentre nessuno di essi rappresenta un mezzo unico di diagnosi differenziale, in realtà essi non avrebbero fatto che confermare con assoluta uniformità, la classificazione stabilita più semplicemente in base agli altri surricordati. Molti altri metodi poi non mi sembrano costituire, rispetto a questi, che un inutile *bis in idem*, essendo basati su manifestazioni più o meno apparentemente diverse delle medesime attività biochimiche dei batteri e quindi non possono risultare di nessun utile sussidio diagnostico.

Mi limito dunque, per raggruppare e classificare i microrganismi isolati, ad esporre il risultato dei metodi di ricerca che mentre servono a mettere in luce proprietà veramente caratteristiche dei singoli microrganismi, d'altro lato mi si sono dimostrati di un'assoluta sicurezza e costanza di risultati. Tutti quanti infatti (come già notai parlando della mobilità e della colorazione delle ciglia) ripetuti più volte, comparativamente, anche a distanza di varii anni (con la maggior possibile identità di materiale e di tecnica) mi hanno sempre dato risultati chiari e concordi non solo qualitativamente, ma, ove era il caso (rapidità di coagulazione del latte, quantità di gas sviluppato in brodo glucosato, ecc.), anche quantitativamente!

Il che mi induce ad insistere ancora una volta, come conclusione di ordine generale, derivante da un'assidua osservazione pratica di molti anni, sulla mia impressione recisamente contraria, non pure alle pretese trasformazioni, ma anche alle semplici modificazioni che da molti si ritengono potersi verificare colla massima facilità nella morfologia e nelle attitudini biologiche dei microrganismi di cui ci occupiamo, mantenuti per lungo tempo nei comuni mezzi nutritivi. *Astrazion facendo dalle naturali modificazioni della virulenza, per ciò che riguarda tutte le altre particolarità morfologiche, biologiche, culturali sopra elencate, io non ho avuto modo di constatare la più piccola variazione in microrganismi coltivati, con trapianti successivi, per 3-4 e, in alcuni casi* (*esemplari di tifo e di* b. coli) *anche 8-10 e più anni!*

IV.

Classificazione dei bacilli isolati, in base ad alcuni caratteri morfologici, biologici e culturali.

Riferisco ora i caratteri dei microrganismi isolati, riunendoli in un certo numero di gruppi, per ognuno dei quali comincio con l'esporre i caratteri che le individualizzano, dando poi la lista dei microrganismi corrispondenti, col numero che essi portano nel mio libro di appunti e coll'indicazione della loro provenienza e della data dell'isolamento.

A.

Colonia su piastra di gelatina. — Tipicamente tifosimile (eccezionalmente atipica).

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli misuranti in media 2-3 $\times$ 0,6-0,9 μ isolati o riuniti a due a due, e talora in filamenti più o meno lunghi. In colture in brodo a 37° o a 20° molto recenti, appaiono tutti mobilissimi secondo il terzo tipo suddescritto (pag. 190). Tale mobilità si mantiene a lungo nelle colture (o anche nelle goccie pendenti convenientemente protette) se tenute a temperatura piuttosto bassa (non superiore a 15°); a 37° invece la mobilità va rapidamente diminuendo, man mano che aumenta lo sviluppo della cultura, tantochè dopo 24 ore gran parte dei bacilli sono immobili. Lo stesso dicasi delle culture in agar molto umido. Di pari

passo con la mobilità varia il numero e l'aspetto delle ciglia. Da culture in agar inumidito, sia a 20° che a 37°, ma molto recenti (rispettivamente 12-18, 5-6 ore) si hanno ciglia molto numerose, 12-15-20 e più, per ogni individuo di dimensioni normali, e numerosissime, in proporzione, nei filamenti. Sono di lunghezza variabile, ma che raggiunge spesso i 12-15 e più μ, e di notevole costanza di forma, presentandosi con 4, 5 e più spire regolari e ben pronunziate. (Cfr. fig. 6-7). Nelle culture meno recenti, il numero delle ciglia e dei microrganismi che ne sono forniti va gradatamente diminuendo fino a ridursi a zero nelle culture immobili per vecchiezza.

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Intorbida uniformemente, senza sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa rapidamente senza coagulazione nè altra apprezzabile modificazione del mezzo.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Non sviluppa.

II. Colorazione rosea.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 1. Conservato in laboratorio mercè trapianti successivi, almeno fin dal 1893.

N. 2. Inviatomi dal prof. Abba da Torino (1900).
» 3. Id. prof. Sclavo da Siena (1900).
» 4. Id. prof. Silvestrini da Firenze (1900).
» 5. Isolato da me, dalla milza di un cadavere (1898).
» 6. Id. id. (1899).
» 14. Id. id. (1899).
» 31. Id. id. (1901).
» 32. Id. id. (1901).
» 119. Id. id. (dicembre 1903).
» 120. Acquistato dal laboratorio di Krahl (gennaio 1904).
» 123. Isolato colla puntura della milza di un tifoso (2 gennaio 1905).

B.

Colonia su piastra di gelatina. — Tifosimili atipiche. *Macroscopicamente* tutte le colonie superficiali e profonde appaiono bianche, rotondeggianti, assai bene delimitate, differenziabili solo per la maggiore dimensione delle prime. *Microscopicamente*, le colonie pro-

fonde appaiono tonde, granulose, a margini netti, di colorito gialletto più o meno intenso; le superficiali, più ampie, sono pure giallette, a margini netti, granulose, con o senza mammellone, per lo più senza striatura caratteristica, talvolta con superficie screpolata o irregolarmente solcata da linee irradianti dal centro verso la periferia.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli di dimensioni uguali all'incirca a quelli del gruppo **A**; essi pure poco mobili se coltivati a 37°, mobilissimi da brodo o da agar tenuti a 20°. Dalla coltura in agar umido a 20° si colorano ciglia del solito aspetto, in numero assai notevole, ma inferiore a quello dei bacilli del gruppo **A**, non oltrepassandosi di regola le 10-12. (Cfr. fig. 8).

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Intorbida uniformemente senza sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificarne l'aspetto.

Liquidi di Capaldi e Proskauer. — I e II. Colorazione leggermente rosea.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 28. Isolato dalla condottura dell'acqua dell'Istituto d'igiene (18 aprile 1902).
» 41. Dall'acqua della conduttura di Pisa (25 aprile 1902).
» 49. Dall'orina di un prostaticò (luglio 1902).
» 68. Da acqua di pozzo dell'Istituto d'igiene (1902).
» 98. Dall'acqua dell'Arno (30 gennaio 1903).
» 108. Da un campione di acqua sorgiva della campagna lucchese (marzo 1903).
» 122. Da una farina (5 ottobre 1903).

C.

Colonie su piastra di gelatina. — In alcuni casi tifosimili tipiche, in altri atipiche (come **B**).

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli sempre isolati, delle solite dimensioni. La cultura in brodo o in agar a 37° anche molto recente (6-7 ore) fa vedere all'esame in goccia pendente molti bacilli immobili, altri mobili disordinatamente, a scatti: la mobilità è molto maggiore e può dirsi generale, nelle culture sviluppate a 20°, e, se si tratta di culture in agar, quando questo è umido; però conserva il carattere in un movimento brusco, a scatti,

spesso disordinato. Si mette molto facilmente in evidenza un unico ciglio terminale (cfr. fig. 9 e 10).

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Sviluppa assai lentamente e di preferenza nel ramo aperto del tubo ad U, senza produzione di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificare l'aspetto del latte.

Liquidi di Capaldi e Proskauer. — I vari esemplari si comportano diversamente, ma per lo più si ha:

I. Sviluppo scarsissimo, senza modificazioni del colorito;
II. Lieve colorazione rosea.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 35. Isolato dall'acqua distillata (1902).
» 43. Dall'acqua della conduttura cittadina (aprile 1902).
» 74. Dall'acqua del pozzo dell'Istituto d'igiene (11 novembre 1902).
» 76. Da acqua minerale di Hunyadi Janos (16 novembre 1902).
» 87. Da un cespuglietto formatosi intorno all'apertura di un rubinetto della conduttura dell'acqua nell'Istituto d'igiene (1902).
» 115. Da acqua minerale di Hunyadi Janos (luglio 1903).

D.

Colonie su piastra di gelatina. — Tifosimili atipiche.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli di 2-3 × 0,6-0,9 μ circa, che sviluppano a 37° spesso poco mobili, mentre a temperatura di 15°-20°, che sembra rappresentare l'*optimum*, sono straordinariamente mobili. Da coltura in agar umido a 20° si hanno bellissime colorazioni di ciglia, disposte in due ciuffi polari (cfr. fig. 11).

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Sviluppa di preferenza nel ramo aperto del tubo ad U senza produzione di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificarne l'aspetto.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 16. Dall'acqua della conduttura dell'Istituto d'igiene (giugno 1901).
» 33. Dall'aria dell'Istituto d'igiene (1° maggio 1902).
» 51. Da un campione di acqua sorgiva di San Vincenzo (1902).
» 56. Dall'aria (maggio 1902).

N. 59. Dall'aria dell'Istituto d'igiene (giugno 1902).
» 95. Dall'acqua dell'Arno (18 gennaio 1903).
» 106. Dall'acqua della conduttura cittadina (20 gennaio 1903).
» 114. Dall'acqua della conduttura cittadina (giugno 1903).

E.

Colonie su piastra di gelatina. — Le profonde sono piccole, rotonde: al microscopio appaiono chiarissime, trasparenti. Le superficiali sono sottilissime, molto espanse in superficie, fortemente lobate; al microscopio, perfettamente incolore e trasparenti, finissimamente granulose.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Diplobacillo piuttosto grande (3-3,5 × 0,8-1 μ) mobile vivamente, con 10-12 ciglia peritriche (da agar umido a 20°).

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Intorbida uniformemente senza sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificarne l'aspetto.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Colorazione azzurra;

II. Lieve colorazione azzurra: ben presto (18-24 ore) il liquido diviene incoloro.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 25. Isolato dalla milza di un cadavere presunto tifoso (marzo 1902).

F.

Colonie su piastra di gelatina. — Tifosimili atipiche (come **B**: anche le colonie superficiali microscopicamente appaiono colorate assai intensamente in gialletto e hanno per lo più superficie screpolata).

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli di dimensioni assai varie (1,5-3 × 0,5-1 μ), immobili e privi di ciglia.

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Intorbida uniformemente senza sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificarne l'aspetto.

Liquidi di Capaldi e Proskauer. — I e II. Si comportano non uniformemente; alcuni esemplari non sviluppano, alcuni sviluppano senza modificare il colore dei liquidi, altri lo modificano in vario modo.

Bacilli appartenenti a questo gruppo.

N. 36. Isolato dal latte (1° maggio 1902).
» 38. Dall'acqua della conduttura urbana (25 aprile 1902).
» 40. Dall'aria di una stalla (7 maggio 1902).
» 46. Dall'orina di un prostatico (aprile 1902).
» 47. Dall'aria dell'Istituto d'igiene (20 maggio 1902).
» 52. Da feci di cavia sana (maggio 1902).
» 54. Dall'acqua della conduttura dell'Istituto d'igiene (27 ottobre 1902).
» 60. Dal latte (ottobre 1902).
» 62. Dall'acqua della conduttura urbana (ottobre 1902).
» 72. Dall'aria del giardino dell'Istituto d'igiene (novembre 1902).
» 75. Da feci di cavia sana (11 novembre 1902).
» 79. Dall'acqua minerale di Janos (9 novembre 1902).
» 81. Dall'acqua della condottura dell'Istituto (novembre 1902).
» 82. Dall'aria del giardino dell'Istituto (13 novembre 1902).
» 86. Dal burro (gennaio 1903).
» 88. Dall'acqua di Cinciano (1903).
» 89. Da un serbatoio di acqua di pozzo (febbraio 1903).

G.

Colonia su piastra di gelatina. — Tipicamente tifosimile, ma con sviluppo assai più rapido di quelle del gruppo **A**, e talvolta con striatura caratteristica un po' meno marcata.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli isolati di 2-4 $\mu \times$ 0,6-0,9 μ, ma per lo più riuniti a due a due e talvolta in brevi catenelle o in filamenti; molto mobili nelle culture giovanissime e specialmente se a bassa temperatura (18°-20°), presso a poco come quelli del gruppo **A**; la mobilità però si riduce assai rapidamente, cosicchè dopo poche ore di sviluppo la maggior parte dei microrganismi ha movimenti interrotti, disordinati, con bruschi cambiamenti di direzione, e rivolgimenti intorno a tutti gli assi del corpo. Le culture a 37° dopo 24-36 ore sono pressochè immobili. Nelle culture a 37°, specie se l'agar è asciutto, le ciglia talvolta mancano, o sono molto scarse, corte e irregolarmente disposte, verificandosi quella varietà di reperti che si è constatato essere riferiti dai vari autori come disposizione tipica delle ciglia del *b. coli.* Le

cose vanno del tutto diversamente quando si usi agar inumidito, si abbia cura di cogliere la cultura nei primi stadi di sviluppo, e soprattutto se si adotti come regola generale di partire da culture sviluppate a 18°-20° (per 12-18-24 ore). Così la ricordata incertezza scompare del tutto avendosi invece il reperto costante di numerose ciglia disposte tutto all'intorno del corpo batterico. Esse in paragone con quelle dei bacilli appartenenti al gruppo **A**, appaiono per solito di numero un po' minore (10-12) e un po' più corte (8-10 μ) e con un minor numero di incurvature, ma talvolta si osservano anche delle forme pressochè identiche a quelle del gruppo **A**, rispetto al quale, pertanto, la differenziazione dei bacilli del gruppo **G**, non può basarsi in modo sicuro su questo carattere (cfr. fig. 12).

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Intorbida uniformemente con sviluppo abbondante di gas.

Reazione dell'indolo. — Positiva.

Cultura in latte a 37°. — Dà luogo a coagulazione.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Assume colorazione rosea.

II. Assume colorazione azzurra. Spesso però (come si è accennato altrove) queste colorazioni non sono permanenti, ma si modificano coll'invecchiare della cultura.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 8. Isolato dall'acqua della condottura urbana (marzo 1898).
» 9. Isolato dall'acqua della condottura urbana (maggio 1899).
» 10. Da acqua di pozzo della Scuola medica di Pisa (maggio 1899).
» 12. Avuto dal dott. Anzillotti (1901).
» 19. Dalle feci di un adulto sano (G...) (gennaio 1901).
» 22. Dalle feci dello stesso (24 marzo 1902).
» 23. Dall'intestino di una cavia uccisa (10 aprile 1902).
» 24. Dalle feci di un coniglio (13 aprile 1902).
» 27. Dalla milza di un cadavere presunto tifoso, da cui si isolò contemporaneamente il n. 25 (**E**) (marzo 1902).
» 29. Dalle feci del solito individuo sano (19 aprile 1902).
» 30. Avuto dal dott. Anzillotti (aprile 1902).
» 34. Dalle feci di una persona sana (maggio 1902).
» 58. Dalle feci diarroiche del solito individuo (G...) (26 ottobre 1902).
» 63. Dalle feci di una persona sana (26 ottobre 1902).
» 64. Dalle feci di una persona sana (26 ottobre 1902).
» 67. Dalle feci di un cane sano (ottobre 1902).
» 69. Dall'acqua della condottura cittadina (6 novembre 1902).
» 70. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 27 ottobre 1902).
» 77. Dalle feci del solito individuo sano (G...) (6 novembre 1902).

N. 83. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 7 novembre 1902).
» 90. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 31 dicembre 1902).
» 94. Dalle feci di un presunto tifoso (20 gennaio 1903).
» 97. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 23 gennaio 1903).
» 99. Id. id. (autopsia 27 gennaio 1903).
» 100. Id. id. (autopsia 28 gennaio 1903).
» 102. Id. id. (autopsia 5 febbraio 1903).
» 107. Da feci diarroiche del solito individuo (G...) (2 marzo 1903).
» 113. Da feci di cavia (aprile 1903).
» 116. Dalle feci del solito individuo (G...) (20 ottobre 1903).
» 118. Dall'orina di un individuo sano (aprile 1903).

H.

Colonie su piastra in gelatina.
Morfologia e mobilità dei singoli individui.
Cultura in brodo glucosato a 37°.
Cultura in latte a 37°.
Liquidi di Capaldi e Proskauer.
} Come G.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 7. Isolato dall'acqua della condottura urbana (gennaio 1900).
» 15. Avuto dal prof. Abba da Torino (1900).
» 50. Da un campione di acqua sorgiva di San Vincenzo (1902).
» 65. Dall'acqua distillata dell'Istituto d'igiene (ottobre 1902).
» 80. Da feci di cavia sana (novembre 1902).
» 84. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 9 novembre 1902).
» 91. Dalle feci di un presunto tifoso (gennaio 1903).
» 92. Dalle feci di altro presunto tifoso (gennaio 1903).
» 93. Dalle feci di altro presunto tifoso (gennaio 1903).
» 112. Dalle feci di un uomo sano (marzo 1903).
» 121. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 27 ottobre 1903).

I.

Colonie su piastra di gelatina. — Tipicamente tifosimili, ma con sviluppo assai rapido, cosicchè anche le colonie superficiali assumono presto un colorito gialletto.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli di 2-3 ✕

0,5-0,9 μ, isolati o a due a due o in brevi catene, sempre immobili (o con moto browniano) e privi di ciglia.

Cultura in brodo glucosato. *Reazione dell'indolo.* *Cultura in latte.* *Liquidi di Capaldi e Proskauer.*	Come G.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 17. Isolato dall'acqua della condottura dell'Istituto d'igiene (ottobre 1901).
» 20. Dalla milza di un cadavere di presunto tifoso (1901).
» 21. Dalla milza di un cadavere di presunto tifoso (gennaio 1902).
» 39. Da feci diarroiche del medesimo individuo (G...) da cui furono isolati gli esemplari 19, 22, 29, 58, 77, 107, 116 (G) (maggio 1902).
» 48. Dal pus di un ascesso del cieco (maggio 1902).
» 66. Da feci di un individuo sano (novembre 1902).
» 101. Dall'intestino di un cadavere (autopsia 3 febbraio 1903).
» 104. Da feci diarroiche del solito individuo (G...; cfr. n. 103 N) (15 febbraio 1903).
» 105. Da feci di cavia (27 febbraio 1903).
» 111. Dall'acqua dell'Arno (7 marzo 1903).
» 117. Da feci del solito individuo sano (G...) (17 ottobre 1903).

K.

Colonie su piastra in gelatina. *Morfologia e mobilità dei singoli individui.* *Cultura in brodo glucosato.*	Come G.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppo abbondante senza modificazione apprezzabile dell'aspetto del latte.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Sviluppo molto tardivo; colorazione leggermente rosea dopo 60-72 ore.

II. Sviluppo rapido: colorazione rosea che più tardi vira all'azzurro.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 11. Isolato dalla condottura dell'acqua dell'Istituto d'igiene (1900).
» 37. Dall'acqua di un pozzo (18 aprile 1902).
» 45. Dall'acqua del pozzo dell'Istituto d'igiene (10 maggio 1902).

N. 61. Dalle feci del solito individuo sano (G...) da cui sono stati isolati gli esemplari dei gruppi **G**, **I**, **N** (24 ottobre 1902).
» 73. Da feci di cavia sana (6 novembre 1902).
» 85. Dall'aria del giardino dell'Istituto d'igiene (11 novembre 1902).

L.

Colonie su piastra di gelatina. — Tifosimili atipiche (come **B**).

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli delle solite dimensioni, immobili (o animati da movimento browniano): manca ogni traccia di ciglia.

Cultura in brodo glucosato. — Intorbidamento uniforme e sviluppo abbondante di gas.

Reazione dell'indolo. — Negativa.

Cultura in latte a 37°. — Dà luogo molto rapidamente a coagulazione.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Colorazione rosea;

II. Colorazione azzurra.

Bacilli appartenenti a questo gruppo.

N. 13. Isolato dall'orina di un prostatico (1901).
» 55. Da un'acqua minerale (ottobre 1902).
» 57. Dall'aria (ottobre 1902).
» 71. Dall'aria (6 novembre 1902).
» 109. Da un'acqua sorgiva dei dintorni di Lucca (6 marzo 1903).

M.

Colonie su piastra di gelatina. — Tipicamente tifosimili.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli delle solite dimensioni. Le culture in brodo o in agar a 37° sono talvolta poco, talvolta assai mobili; mobilissime quelle a bassa temperatura (15°-20°) che appaiono dotate di ciglia numerose (10-12 e più).

Cultura in brodo glucosato a 37°. — Intorbida uniformemente con sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Positiva.

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificarne l'aspetto.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Non sviluppa;

II. Assume colorazione azzurra.

Bacilli appartenenti a questo gruppo.

N. 42. Isolato dall'orina di un prostatico (aprile 1902).
» 44. Dall'orina di altro prostatico (aprile 1902).
» 53. Da un'acqua minerale (gennaio 1903).

N.

Colonie su piastra di gelatina. — Tifosimili tipiche.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli delle solite dimensioni, assai mobili nelle culture recenti sia a 37° che a 20°, con ciglia numerose (10-12 e più).

Cultura in brodo glucosato. — Intorbida uniformemente senza sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Positiva.

Cultura in latte a 37°. — Coagula rapidamente.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Colorazione rosea;

II. Leggera colorazione azzurrognola.

Bacilli appartenenti a questo gruppo.

N. 103. Dalle feci dell'individuo (G...) da cui sono stati altra volta isolati gli esemplari dei gruppi **G**, **I**, **K**. Fu isolato (15 febbraio 1903) contemporaneamente al n. 104 (**I**) da una scarica diarroica avvenuta dopo un grave disturbo (senso di vertigini, forte cefalea, vomito, ecc).

O.

Colonie su piastra in gelatina. — Tifosimili tipiche.

Morfologia e mobilità dei singoli individui. — Bacilli delle solite dimensioni immobili e privi di ciglia.

Cultura in brodo glucosato. — Intorbida uniformemente senza sviluppo di gas.

Reazione dell'indolo. — Positiva.

Cultura in latte a 37°. — Dà luogo a coagulazione.

Liquidi di Capaldi e Proskauer:

I. Colorazione rosea;

II. Colorazione azzurra.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 26. Isolato da un ascesso dal dott. Anzillotti (1902).

P.

Colonie su piastra in gelatina. *Morfologia e mobilità dei singoli individui.* *Cultura in brodo glucosato.* *Reazione dell'indolo.* *Liquidi di Capaldi e Proskauer.*	Come **O.**

Cultura in latte a 37°. — Sviluppa senza modificazioni apprezzabili del latte.

BACILLI APPARTENENTI A QUESTO GRUPPO.

N. 18. Avuto dal dott. De Hyeronimis (1901).
» 78. Isolato da feci di individuo sano (1901).
» 96. Dall'acqua dell'Arno (gennaio 1902).

Designazione del gruppo	Aspetto delle colonie su piastra di gelatina (se tipicamente o atipicamente tifosimili)	Numero e disposizione delle ciglia (cifra normale nei preparati ben riusciti)	Sviluppo di gas in brodo glucosato	Reazione dell'indolo	Coagulazione del latte	Colorazione assunta dai liquidi di Capaldi e Proskauer (dopo 18-36 ore di sviluppo a 37°)		Numero d'ordine dei vari esemplari isolati
						I	II	
A	Tipiche	Numerosissime (15-20 e più) peritriche.	—	—	—	(Non sviluppa)	Rosea	1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 31, 32, 119, 120, 123.
B	Atipiche	Numerose (10-12) peritriche.	—	—	—	Rosea debole	Rosea debole	28, 41, 49, 68, 98, 108, 122.
C	Tipiche e atipiche .	1 polare	—	—	—	?	Id.	35, 43, 74, 76, 87, 115.
D	Atipiche	Due ciuffi polari . . .	—	—	—	(Non sviluppa)	Immutata	16, 33, 51, 56, 59, 95, 106, 114.
E	Sottilissime, espanse, lobate, trasparenti.	Numerose (10-12 e più) peritriche.	—	—	—	Azzurra	Azzurra debole	25.
F	Atipiche	Mancanti	—	—	—	Diversa nei vari esemplari	Diversa nei vari esemplari	36, 38, 40, 46, 47, 52, 54, 60, 62, 72, 75, 79, 81, 82, 86, 88, 89.
G	Tipiche	Numerose (10-12 e più) peritriche.	+	+	+	Rosea	Azzurra	8, 9, 10, 12, 19, 22, 23, 24, 27, 29, 30, 34, 58, 63, 64, 67, 69, 70, 77, 83, 90, 94, 97, 99, 100, 102, 107, 113, 116, 118.

Designazione del gruppo	Aspetto delle colonie su piastra di gelatina (se tipicamente o atipicamente tifosimili)	Numero e disposizione delle ciglia (cifra normale nei preparati ben riusciti)	Sviluppo di gas in brodo glucosato	Reazione dell'indolo	Coagulazione del latte	Colorazione assunta dai liquidi di Capaldi e Proskauer (dopo 18-36 ore di sviluppo a 37°)		Numero d'ordine dei vari esemplari isolati
						I	II	
H	Tipiche	Numerose (10-12) peritriche.	+	—	+	Rosea	Azzurra	7, 15, 50, 65, 80, 84, 91, 92, 93, 112, 121.
I	Id.	Mancanti	+	+	+	Id.	Id.	17, 20, 21, 39, 48, 66, 101, 104, 105, 111, 117.
K	Id.	Numerose (10-12) peritriche.	+	—	—	Id.	Rosea	11, 37, 45, 61, 73, 85.
L	Atipiche	Mancanti	+	—	+	Id.	Azzurra	13, 55, 57, 71, 109.
M	Tipiche	Numerose (10-12) peritriche.	+	+	—	(Non sviluppa)	Id.	42, 44, 53.
N	Id.	Id.	—	+	+	Rosea	Azzurra deb. ?	103.
O	Id.	Mancanti	—	+	+	Id.	Azzurra	26.
P	Id.	Id.	—	+	—	Id.	Id.	18, 78, 96.

***

Se ci facciamo ad esaminare i caratteri dei singoli gruppi nei quali sono stati suddivisi i 123 esemplari studiati (e che si sono sinteticamente riuniti nell'annesso quadro sinottico) risultano evidenti, per ora, le seguenti osservazioni:

Il gruppo **A** *presenta i caratteri tipici del* bacillo del tifo, *con assoluta identità nei vari esemplari, da quello trapiantato in cultura per ormai 11 anni almeno (n. 1), a quello esaminato nella cultura sviluppatasi 6-7 ore dopo la puntura della milza di un tifoso (n. 123). I gruppi* **B** *ed* **E** *presentano le più importanti note culturali del b. del tifo, ma ho creduto di poterli differenziare in base ai caratteri dell'atipicità delle culture, del minor numero di ciglia, dello sviluppo nel I liquido di Capaldi e Proskauer. I gruppi* **C**, **D**, **F** *pur presentando i medesimi caratteri culturali, sono molto più sicuramente differenziabili per il criterio morfologico, trattandosi di microrganismi monotrichi o lofotrichi, o privi assolutamente di ciglia.*

I gruppi **G** *e* **I** *corrispondono per i caratteri morfologici e culturali al* bacterium coli, *dovendosi stabilire che questo tipo può ridursi a due forme nettamente distinte: una mobilissima e con ciglia disposte tutto all'intorno del corpo e assai numerose [tanto che a volte non è facile la differenziazione, in base a questo carattere, dal bacillo del tifo] e una seconda forma assolutamente immobile e priva di ciglia [che corrisponde al* b. coli *immobilis di Germano e Maurea (26)]. Le forme intermedie con mobilità scarsa o dubbia e con poche ciglia irregolarmente disposte, non esistono in realtà ma sono in rapporto con condizioni sfavorevoli o stadi troppo avanzati di sviluppo delle culture prese in esame. Quanto alle forme monotriche e lofotriche da alcuni descritte, esse non possono assolutamente attribuirsi al b. coli.*

Il gruppo **H** *non si differenzia dal* **G** *se non per la mancata reazione dell'indolo, e sarebbe quindi da identificarsi colla varietà* b. coli anindolicum *descritta da vari autori.*

Gli ultimi sei gruppi **K**, **L**, **M**, **N**, **O**, **P**, *generalmente a colonia tipicamente tifosimile, si differenziano nettamente dal b. del tifo e dal* b. coli *per vari caratteri morfologici e culturali, e sono evidentemente da riportarsi alle forme cosiddette* tifosimili *e* colisimili.

V.

Ricerche sierodiagnostiche.

La classificazione da me stabilita dei microrganismi a colonia tifosimile, in base suppergiù agli stessi criterii dei quali solamente hanno potuto approfittare la maggior parte degli autori che si sono finora occupati dell'argomento, non poteva oggi fare a meno del controllo della prova di sieroreazione, data la somma importanza che giustamente si attribuisce a questo moderno metodo di diagnosi batteriologica. E tanto più si imponeva la necessità di controllare con tal mezzo la individualità dei gruppi da me stabiliti inquantochè io, basandomi su criterii a cui molti autori attribuiscono importanza del tutto secondaria, quali l'aspetto della colonia, il numero delle ciglia, ecc., ho voluto nettamente distinguere dal bacillo del tifo molti germi che con esso hanno a comune le più importanti note culturali, e d'altro lato mercè lo studio accurato delle ciglia e la determinazione esatta delle condizioni in cui deve essere esaminato il carattere della mobilità, ho creduto di poter ridurre a due gruppi di ben definiti caratteri morfologici e culturali le numerose e più o meno reali varietà che si sono finora descritte col nome di *bacterium coli*.

Ho proceduto pertanto, dopo fissata la classificazione, allo studio sierodiagnostico dei vari gruppi, scegliendo per ciascuno di essi 1 o 2 esemplari, in tutto 20, ed eseguendo le varie e lunghe ricerche con la tecnica seguente, rigorosamente uguale per tutte.

Stabilita la dose massima ben sopportata di cultura in brodo di 24 ore di ciascuno dei 20 esemplari, tale dose veniva inoculata endoperitonealmente a un coniglio. Si ripetevano le inoculazioni di dosi progressivamente crescenti di cultura di 8 in 8 giorni. Dopo la 5ª o la 6ª inoculazione si salassava l'animale e ottenutone il siero se ne saggiava coi metodi consueti (micro-e macroscopici) il potere agglutinante sul microrganismo corrispondente; stabilendo la diluizione massima che dava luogo a una netta agglutinazione.

Consecutivamente si saggiava il potere agglutinante del siero stesso a una diluizione di poco minore su tutti i microrganismi del medesimo gruppo, e a una diluizione ridotta della metà su tutti o moltissimi dei germi appartenenti agli altri gruppi.

Dato il grandissimo numero di ricerche da farsi, preferivo di

solito il saggio microscopico molto più semplice e spedito, ma in molti casi, e sempre per i microrganismi immobili per i quali tale saggio spesso non da buon risultato, feci anche la ricerca macroscopica.

***

Riferisco senz'altro il risultato di queste ricerche:

Gruppo **A**. — 1. Un coniglio viene inoculato nel peritoneo, di 8 in 8 giorni con 1, 2, 4, 6, 8, 8 cmc. di cultura in brodo di 24 ore del bacillo n. 4. Il siero agglutina nettamente il 4 alla diluizione di 1 : 2500.

2. Un altro coniglio viene inoculato con 0. 2, 0. 5, 1, 2, 3 cmc. di cultura in brodo di 24 ore del bacillo n. 119. Il siero agglutina nettamente il 119 alla diluizione di 1 : 1500.

I due sieri alla diluizione di 1 : 1500 agglutinano tutti i microrganismi del gruppo **A**; *diluiti a 1 : 800 non hanno nessuna azione su tutti gli altri microrganismi.*

Gruppo **B**. — 1. Inoculazione con 1, 2, 4, 6, 8 cmc. di cultura n. 28.

Agglutinazione 1 : 2000.

Il siero alla diluizione di 1 : 1000 agglutina i bacilli nn. 28, 41, 68, 108; non agglutina, nemmeno alla diluizione di 1 : 500, gli altri microrganismi dello stesso gruppo, e quelli degli altri gruppi.

2. Inoculazione con 1, 2, 4, 6, 8 cmc. di cultura n. 122.

Agglutinazione 1 : 1200.

Il siero, diluito 1 : 1000 agglutina solo i bacilli nn. 98 e 122, non ne agglutina nessun altro nemmeno diluito 1 : 500.

Gruppo **C**. — Inoculazione di 0. 5, 1, 2, 4, 8 cmc. di cultura n. 35.

Agglutinazione 1 : 900.

Il siero diluito 1 : 900 agglutina i bacilli nn. 35, 43, 74, 76. Non agglutina nessun altro (compresi i nn. 87 e 115 dello stesso gruppo) nemmeno diluito 1 : 500.

Gruppo **D**. — Inoculazione di 0. 2, 0. 5, 1, 2, 4, 6 cmc. di cultura n. 106.

Agglutinazione 1 : 1300.

Il siero diluito 1 : 1000 agglutina tutti i bacilli del gruppo **D**; *non agglutina nessun altro nemmeno diluito 1 : 500.*

Gruppo E. — Inoculazione di 0. 1, 0. 5, 1, 3, 5, cmc. di cultura n. 25.

Agglutinazione 1 : 3000.

L'agglutinazione si verifica solo col n. 25; è negativa anche a diluizione di 1 : 1000 con tutti gli altri esemplari.

Gruppo F. — *La sierodiagnosi dà risultati pressochè negativi. Con ripetute inoculazioni dei microrganismi nn. 38 e 52, si ottennero sieri molto debolmente agglutinanti (rispettivamente 1 : 20 e 1 : 50) e solo per il microrganismo stesso usato.*

Gruppo G. — 1. Inoculazione di 1, 2, 4, 6, 8 cmc. di cultura n. 19.

Agglutinazione 1 : 1200.

Il siero diluito a 1 : 1000 agglutina i bacilli nn. 8, 9, 10, 19, 22, 34, 58, 63, 64, 67, 83, 94, 100, 102, 107. Non agglutina nessun altro, nemmeno diluito a 1 : 500.

2. Inoculazione di 0. 2, 0. 5, 1, 2, 3 cmc. di cultura n. 99.

Agglutinazione 1 : 1000.

Il siero alla diluizione di 1 : 800 agglutina soltanto i nn. 23, 30, 99, 116; non agglutina nemmeno a diluizione di 1 : 400 gli altri microrganismi del suo e degli altri gruppi.

Gruppo H. — Inoculazione di 0. 5, 1, 2, 4, 8 cmc. di cultura n. 65.

Agglutinazione 1 : 1700.

Il siero alla diluizione di 1 : 1000 agglutina i nn. 7, 15, 50, 65, 91, 92, 93, 112, 121. Non agglutina, nemmeno diluito a 1 : 500 gli altri microrganismi.

Gruppo I. — Inoculazione di 0. 5, 1, 2, 4, 6, 6, 8 cmc. di cultura n. 17.

Agglutinazione 1 : 200.

Il siero alla diluizione di 1 : 200 agglutina i nn. 20, 21, 66, 101; alla diluizione di 1 : 100 agglutina i nn. 105 e 117, e nessun altro. Alla diluizione di 1/50 agglutina diversi microrganismi di vari gruppi (?).

Gruppo K. — Inoculazione di 1, 2, 4, 8 cmc. di cultura n. 11.

Agglutinazione 1 : 1300.

Il siero alla diluizione di 1 : 1000 agglutina tutti i microrganismi del gruppo tranne il n. 85. Non agglutina nessun altro microrganismo nemmeno alla diluizione di 1 : 500.

Gruppo L. — *Con ripetute inoculazioni dei germi 13 e 71 si ottengono sieri agglutinanti rispettivamente alla diluizione di 1 : 20 e 1 : 25 i soli microrganismi usati.*

Gruppo M. — **Inoculazione di 0. 5, 1, 2, 4, 6 cmc. di cultura n. 42.**

Agglutinazione 1 : 1000.

Il siero alla diluizione 1 : 1000 agglutina i tre microrganismi del gruppo; non agglutina nessun altro esemplare, nemmeno alla diluizione 1 : 400.

Gruppo N. — **Inoculazione di 0. 1, 0. 2, 0. 5, 1, 2, 2, 3 cmc. di cultura n. 103.**

Agglutinazione 1 : 600.

Nessun altro esemplare viene agglutinato nemmeno alla diluizione 1 : 200.

Gruppo O. — **Inoculazione di 1, 2, 4, 6, 8 cmc. di cultura n. 26.**

Agglutinazione 1 : 50.

Nessun altro microrganismo viene agglutinato.

Gruppo P. — **Inoculazione di 1, 2, 4, 6, 8, 8, 10 cmc. di cultura n. 96.**

Agglutinazione 1 : 200.

Oltre al n. 96 nessun altro microrganismo viene agglutinato, nemmeno a diluizione di 1 : 25.

***

L'esame dei risultati di queste ricerche sierodiagnostiche dimostra:

che tutti i microrganismi del gruppo A corrispondono evidentemente a una sola specie batterica (bacillo del tifo) da cui bene a ragione si sono nettamente distinti quelli appartenenti ai cinque gruppi successivi (B, C, D, E, F) sebbene abbiano a comune con esso varie importanti note culturali;

che analogamente al primo gruppo anche tutti gli altri sono legittimamente differenziati in base ai caratteri da me studiati, inquantochè il siero che agglutina i microrganismi di un gruppo è privo di azione su tutti gli altri;

che però mentre tutti gli esemplari dei gruppi A, D, M (per tacere dei gruppi E, N, O costituiti di una sola specie) si comportano identicamente di fronte alla sieroreazione, invece negli altri gruppi si osserva che solo alcuni esemplari vengono agglutinati dal siero di animale inoculato con uno di essi; un fatto questo la cui più logica spiegazione sembra sia l'ammettere che i caratteri di cui possiamo disporre per la classificazione non sono sufficienti, conducendoci a riunire in un solo gruppo specie sostanzialmente diverse.

La insufficienza, stabilita in base alla sierodiagnosi, dei raggrup-

pamenti da me stabiliti, ha speciale importanza in rapporto con i tre tipi di *bacterium coli* (G, H, I) sia perchè mi si potrebbe accusare di avere di soverchio ridotto i mezzi di ricerca culturale i quali avrebbero potuto permettere una più minuta classificazione, sia perchè se ne potrebbero dedurre conclusioni sfavorevoli alla tesi da me sostenuta della unificazione delle numerose varietà morfologiche attribuite al *b. coli*. La prima obiezione non ha ragione di essere perchè, come ho altrove dichiarato, io non ho mai trascurato di saggiare anche altri metodi di ricerca culturale; solo ho creduto inutile riferirne i risultati i quali non facevano che confermare il raggruppamento stabilito in rapporto ai criteri da me preferiti. Aggiungerò ora che di fronte ai risultati della sierodiagnosi, io ho appositamente ripreso lo studio dei tre gruppi di *bacterium coli,* aggiungendo ai citati anche i seguenti altri metodi di ricerca: brodo fenolftaleinico di Abba, agar di Drigalski e Conradi, brodo epatico di Cesaris-Demel, gelatina di Piorkowsky, patata, agar lattosato al tornasole di Wurtz. Ebbene, nessuna ulteriore netta suddivisione fu possibile in base a tali metodi culturali, verificandosi solo differenze più o meno spiccate nel grado, mai nell'andamento specifico della reazione. Nè alcun indizio io potei ricavare da qualche tentativo di saggio della virulenza (mediante inoculazioni nelle cavie) che si manifestò affatto indipendente dai risultati della sierodiagnosi! Cosicchè è chiaro che con i mezzi a nostra disposizione è impossibile ottenere una più minuta ripartizione degli esemplari del *b. coli:* e tale conclusione giustifica pienamente il raggruppamento da me fatto, una volta che ho dimostrato che le varietà da altri osservate nei caratteri morfologici dipendono da imperfezioni di tecnica o da errori di osservazione.

Resterebbe ora a domandarci se in realtà si debba ammettere questa diversità di specie batteriche con identici caratteri morfologici e culturali, o se piuttosto non si debba accettare l'opinione di coloro i quali (Fodor e Riegler (27), Wolf Sydney (27), Radziewsky (27), Di Donna (28), Besson (12), ecc.), ritengono insufficiente o fallace addirittura la sierodiagnosi in rapporto col *bacterium coli.* Io non credo che sull'argomento sia stata ancora detta l'ultima parola. Intanto non mancano ricerche dimostranti invece una notevole specificità del saggio sierodiagnostico del *bacterium coli:* per esempio, quelle di van der Welde (27) secondo le quali il siero di un cavallo immunizzato con *bacterium coli* agglutinava 21 su 25 campioni di diversa provenienza; e lo stesso risultato ho ottenuto io dappoichè il siero di coniglio inoculato con uno dei miei esemplari ne aggluti-

nava altri 14 di provenienza la più svariata, il siero di un secondo coniglio ne agglutinava altri 3. Stando così le cose, fino a sicura prova in contrario non si saprebbe comprendere perchè il *b. coli* dovrebbe sottrarsi a una legge generale cui soggiacciono in grado maggiore o minore tutti gli altri bacteri. Nell' interpretazione di molti dei risultati negativi conviene poi tener conto da un lato della rapida e notevole caducità delle ciglia del *bacterium coli*, d'altro lato della parte importantissima (che anche io ho avuto occasione di dimostrare (29), e che spero di potere presto confermare con ulteriori ricerche sperimentali) spettante a questi organi nel fenomeno dell'agglutinazione dei batteri mobili: chiaro risulta da ciò come per lievi imperfezioni di tecnica sia oltremodo facile ottenere risultati dubbi o negativi nel saggio dell'agglutinazione di un microrganismo di cui le ciglia si perdono molto precocemente.

Comunque sia, e pur ammettendo che la questione dell'agglutinazione del *b. coli* meriti di essere ulteriormente studiata, è in ogni modo indiscutibile che la sierodiagnosi conferma la individualità dei tre gruppi stabiliti, pur non potendosi escludere la possibilità di ulteriore differenziazione che non si riesce a stabilire in base ai caratteri morfologici e culturali, che oggi siamo in grado di mettere in rilievo.

VI.

Conclusioni generali.

1. Le note morfologiche, biologiche e culturali dei 123 microrganismi da me studiati, si sono mantenute assolutamente immutate nei trapianti successivi eseguiti (per il massimo numero degli esemplari) per 3–4 e più anni, presentandosi per esempio identiche in un esemplare di b. del tifo isolato da poche ore dalla milza di un ammalato, e in altro coltivato sui mezzi artificiali da circa 12 anni.

2. Lo studio della mobilità dei microrganismi deve farsi negli stadi inizialissimi di sviluppo, e comparativamente su due culture sviluppate a 18°–20° e a 37°: l'indugio di poche ore nell'osservazione in goccia pendente basta per modificarne profondamente il movimento caratteristico. Così la mobilità incerta, disordinata, con bruschi mutamenti di direzione e continui rivolgimenti su tutti gli assi del corpo, descritta come propria del *b. coli* non è che una modificazione del tipo normale di mobilità (simile a quella del tifo),

modificazione che si verifica molto rapidamente (dopo poche ore di sviluppo) specialmente nelle culture tenute a 37°.

3. Per la buona riuscita della colorazione delle ciglia e per potere stabilire con certezza il numero, la forma e la disposizione che esse hanno normalmente nelle varie specie mobili, ha grandissima importanza il modo di preparazione delle culture. Conviene che queste siano fatte su piastra d'agar inumidita con acqua distillata sterile e tenuta a temperatura di 18°-20° fino a comparsa di una lieve patina batterica (10-24 ore) che, diluita opportunamente, costituisce un ottimo materiale per la colorazione.

4. Il cosiddetto gruppo dei microrganismi tifo- e colisimili deve ridursi alle specie presentanti i seguenti caratteri: Bacilli, la cui colonia su gelatina ha l'aspetto di quelle tipiche o atipiche del b. del tifo; — mobili o immobili; — di dimensioni (nei singoli individui) non oltre i 4×1 μ; — aerobi facoltativi; — sviluppantisi a temperatura di 37°; — intorbidanti uniformemente il brodo; — non sporigeni; — non colorabili col metodo di Gram.

5. La diagnosi batteriologica del b. del tifo può stabilirsi con sicurezza sui seguenti caratteri, aggiunti a quelli propri di tutto il gruppo dei tifosimili:

Aspetto della colonia su gelatina (tipica, o eccezionalmente atipica, ma senza notevole deviazione di forma); — mobilità e colorazione delle ciglia (12-20 e più nei preparati ben riusciti); — cultura in brodo glucosato; — in latte; — nei liquidi di Capaldi e Proskauer; — reazione dell'indolo; — prova dell'agglutinazione con siero di animale preparato con cultura sicura di b. del tifo.

6. In base ai medesimi caratteri (e a molti altri pure saggiati) le numerose varietà descritte sotto il nome di *b. coli* possono ridursi a tre specie: la prima e la seconda, differenziabili solo per la presenza o la mancanza della reazione dell'indolo, ma ambedue mobilissime (nelle culture molto recenti) come il b. del tifo e dotate di ciglia peritriche abbondanti ma in generale di numero un po' minore e un po' più corte di quelle del bacillo di Eberth; e una terza forma assolutamente immobile (con movimento browniano) e mancante affatto di ciglia. La prova dell'agglutinazione fa però prevedere la possibilità che ciascuno di questi tre gruppi non sia costituito da un'unica specie, ma sia forse composto di diverse varietà non differenziabili con gli altri mezzi diagnostici di cui noi disponiamo.

7. Sempre in base ai soliti caratteri, ho potuto stabilire altri undici gruppi di microrganismi a colonia tifosimile, controllati dalla prova sierodiagnostica, tra i quali presentano notevole interesse

alcuni che hanno a comune col bacillo del tifo le principali note culturali e se ne differenziano per la forma della colonia, per lo sviluppo dei liquidi di Capaldi e Proskauer, e soprattutto per il criterio morfologico (diversa disposizione, minor numero o mancanza di ciglia). Mette conto di richiamare, in modo speciale, l'attenzione sopra uno di questi gruppi (B) composto di germi isolati per lo più dalle acque e che solo uno studio molto accurato ha permesso di distinguere dal bacillo di Eberth, in base alla atipicità della colonia su gelatina, al numero un po' minore delle ciglia (disposte però come nel b. del tifo) e allo sviluppo positivo nel primo liquido di Capaldi e Proskauer: caratteri questi che non sarebbero forse parsi sufficienti alla differenziazione senza il sussidio della prova dell'agglutinazione.

8. Com'è noto, oggi si sostiene da molti il concetto che, se non il *b. coli*, almeno alcune delle forme di tifosimili rappresentino il risultato di un adattamento del bacillo di Eberth a singoli mezzi o a speciali condizioni dell'ambiente, capaci di indurre in esso notevoli cambiamenti morfologici e biologici. Conviene però riflettere che tali cambiamenti non possono avvenire immediatamente dopo che l'agente del tifo è ricaduto nel mondo esterno, ed è logico altresì pensare che essi dovrebbero presumibilmente verificarsi in fase di vita vegetante. Or avendo noi constatato che il bacillo del tifo, in cultura pura, per 10-12 anni, non presenta la benchè minima modificazione e d'altra parte facendoci le attuali vedute epidemiologiche (Koch, ecc.), contrariamente alle idee della scuola classica, propensi a ritenere molto limitata la esistenza saprofitica nell'ambiente del bacillo di Eberth, se ne deve inferire che, astrazion facendo dalle eventuali difficoltà di isolamento, la dimostrazione del germe del tifo in singoli mezzi dell'ambiente, in dipendenza di accidenti morbosi, deve potersi stabilire, in modo sicuro, in base ai surriferiti caratteri di identificazione.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA III.

Le microfotografie dei principali tipi di colonie sono state da me eseguite con un microscopio Koristka (oc. 3, ob. 2), raccordato ad una camera microfotografica verticale piccolo modello. Ingrandimento controllato col micrometro obiettivo 20 diametri. Esse rappresentano:

FIG. 1 e 2. — *Due forme o meglio due stadi di colonia tifosimile tipica.*

FIG. 3-5. — *Diverse forme di colonie tifosimili atipiche*, le quali non si possono con assoluta precisione attribuire ad uno o ad un altro dei diversi gruppi di microrganismi, ma corrispondono ai vari aspetti che spesso si al-

ternano in un medesimo gruppo, e talvolta, per inapprezzabili influenze, in una medesima specie batterica.

Le microfotografie dei bacilli sono state eseguite col medesimo microscopio Koristka (oc. 4 condensatore, ob. immersione 1/12), raccordato a una comune camera oscura. Ingrandimento 900 diametri. Lastre ortocromatiche Cappelli, schermo al bicromato di potassa.

FIG. 6 e 7. — *Due esemplari di bacillo del tifo (gruppo* **A**, *n. 4 e n. 119).* Si nota l'assoluta identità di numero, di forma e di disposizione delle ciglia: la differenza di spessore, che in realtà non esiste in altri preparati, dipende dal diverso grado di azione della sostanza colorante.

FIG. 8. — *Bacilli del gruppo* **B** *(n. 28).* È evidentissima la differenza nel numero delle ciglia, in confronto col bacillo del tifo.

FIG. 9 e 10. — *Due tipi di bacilli monotrichi appartenenti al gruppo* **C** *(n. 16 e 43).* Si vede che anche l'aspetto microscopico conferma la diversità dei microganismi componenti questo gruppo che si poteva dedurre dal criterio sierodiagnostico.

FIG. 11. — *Bacilli del gruppo* **D** *(n. 33).*

FIG. 12. — *Bacilli del gruppo* **G** *(n. 19).* In luogo di preparati assai più belli (da culture a bassa temperatura) in cui tutti i microrganismi si presentano ricchi di ciglia, ho voluto riprodurre questo (da cultura recente a 37°) nel quale si possono osservare i vari aspetti sotto i quali si presenta il *b. coli*, vedendosi accanto a forme ricche di ciglia presso a poco come il b. del tifo, altre con pochi o con un solo ciglio.

Pisa, gennaio 1905.

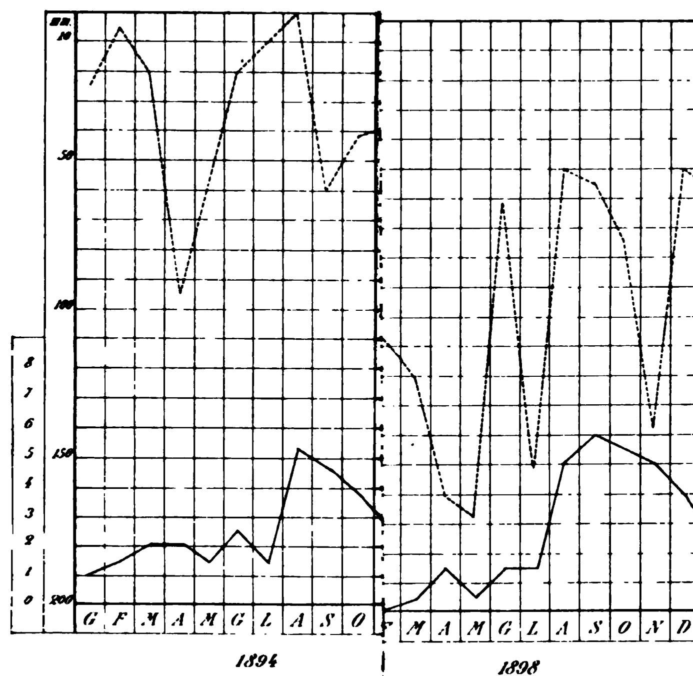
LAVORI CITATI.

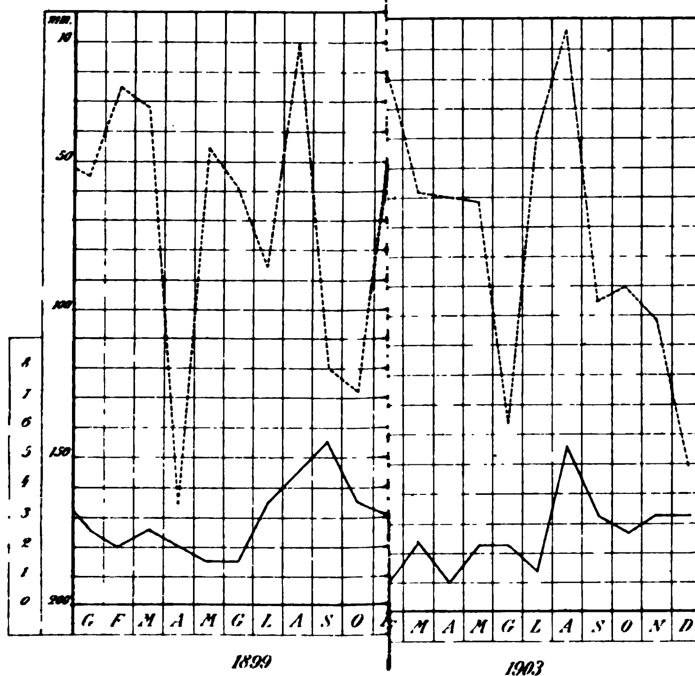
N.B. — *Il raccogliere qui un'estesissima bibliografia sull'argomento dei tifo- e colisimili sarebbe stato altrettanto facile quanto inutile; mi limito quindi a riferire le indicazioni bibliografiche delle opere e delle memorie che ho avuto occasione di citare nel corso del lavoro.*

1. PELLEGRINI. *Contributo allo studio dei bacilli tifosimili nelle acque* (L'Ufficiale sanitario, 1897).
2. ORLOWSKY. *Beitrag zur Kenntnis der biologischen und pathogenen Eigenschaften der Bacterium coli commune* (Centralblatt f. Bakteriologie, 1897).
3. GILBERT. *Contribution à l'étude des bactéries intestinales* (Société de Biologie, 1893).
4. LEMBKES. *Beitrag zu Bakterienflora des Darmes* (Archiv f. Hygiene, 1896 e 1897).
5. REFIK. *Sur les diverses spécies de colibacille des eaux* (Annales Pasteur, 1896).
6. EHRENFEST. *Studien über die « Bacteriumcoli ähnlichen » Mikrorganismen normaler menschlicher Faeces* (Archiv f. Hygiene, 1896).
7. FORD. *Varieties of colon bacilli isolated from man* (Montreal Medic. Journ., 1900).
8. MACÉ. *Traité de Bactériologie.* Paris, 1900, 4ª edizione.

9. MIGULA. *System der Bakterien.* Jena, 1897, II volume.
10. GÜNTHER. *Avviamento allo studio della batteriologia.* Traduzione italiana, Torino, 1902.
11. CELLI. *Manuale dell'Igienista.* Roma, 1904, vol. II.
12. BESSON. *Tecnica microbiologica e sieroterapica.* Traduzione italiana, Torino, 1903.
13. KOLLE und WASSERMANN. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen* (in corso di pubblicazione).
14. TERNI. *La diagnosi differenziale del bacillo del tifo* (Annali dell'Istituto d'igiene sperimentale della R. Università di Roma, 1893).
15. REMY e SUGG. *Recherches sur le bacille d'Eberth-Gaffky* (Annales de la Société de Médecine de Gand, 1893).
16. MATZUSCHITA. *Untersuchungen über die Mikrorganismen der menschlichen Kotes* (Archiv f. Hygiene, 1902).
17. DI VESTEA. *Ricerche ed esperimenti sul bacillo del tifo addominale* (Il Morgagni, 1885).
18. DE' ROSSI. *Di un metodo semplice per colorare le ciglia dei batteri* (Archivio per le Scienze mediche, 1900).
19. DE' ROSSI. *Sulla colorazione delle ciglia dei batteri* (Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1902, e Centralblatt f. Bakteriologie, 1903).
20. DE' ROSSI. *Sui metodi di colorazione delle ciglia dei batteri* (Riv. d'Igiene e Sanità pubblica, 1903).
21. CRISAFULLI. *La reazione rossa del legno di pino per la ricerca dell'indolo, ecc.* (Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1895).
22. CAPALDI e PROSKAUER. *Beiträge zur Kenntniss der Säurebildung bei Typhusbacillen und Bacterium coli, ecc.* (Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten, 1897).
23. ABBA. *Ueber ein Verfahren den B. coli communis schnell und sicher auf den Wasser zu isoliren* (Centralblatt für Bakteriologie, 1896).
24. CESARIS DEMEL. *Sul differente comportamento di alcuni microrganismi in un mezzo nutritizio colorato* (Centralblatt für Bakteriologie, 1899).
25. DRIGALSKI und CONRADI. *Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen* (Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankeiten, 1902).
26. GERMANO e MAUREA. *Vergleichende Untersuchungen über den Typhusbacillus und ähnliche Bakterien* (Ziegler's Beitr. der pathologische Anatomie, ecc., 1893).
27. Citati da DI DONNA (28).
28. DI DONNA. *Sull'agglutinamento del b. coli* (Questi Annali, 1902).
29. DE' ROSSI. *Sui fenomeni di agglutinazione dei batteri* (Archivio per le Scienze Mediche e Centralblatt f. Bakteriologie, 1904.

 — La febbre tifoidea in Firenze.





Istituto d'igiene del R. Istituto di studi superiori di Firenze

La febbre tifoide in Firenze nell'ultimo decennio (1894-1903)

Studio epidemiologico del dott. **A. R. CHIAPPELLA**, assistente.

(Con 11 figure e 4 tavole).

Fra le grandi città italiane Firenze ha sempre avuto la non invidiabile fama di essere una di quelle in cui il tifo fa maggiori stragi.

Da una relazione del Bodio del 1892 si ricava, invero, che Firenze aveva nel decennio 1881-90 una mortalità per tifo assai alta e, se non teneva fra le nostre maggiori città il primato in questo doloroso tributo, venendo dopo Palermo e Milano, occupava però sempre il terzo posto.

Le cifre raccolte dal Bodio, infatti, danno la seguente proporzione annua:

Quadro I. — *Morti per febbre tifoide in rapporto a 10,000 abitanti (1881-90).*

CITTÀ	Media annua	Massima	Minima
Palermo	12.84	19.1	7.7
Milano	7.90	11.1	5.4
Firenze	7.88	10.9	5.4
Torino	6.26	10.7	2.2
Napoli	5.20	9.4	2.5
Roma	4.34	5.5	3.3

A sua volta, una statistica del dott. Boncinelli, già direttore dell'Ufficio municipale d'igiene, dà per il periodo 1881-89 una mortalità media annua di 159, ciò che corrisponde alla cifra di 8.3 per 10,000 abitanti; nello stesso periodo di tempo press'a poco (1881-91) a Genova la mortalità media annua era di 80, eguale cioè a 3.7 per 10,000 abitanti (Lucatello); Milano dava nello stesso tempo (1881-89) una mortalità media di 279 all'anno, pari a 7.9 per 10,000 abitanti (Bordoni-Uffreduzzi).

Secondo questi ultimi dati, adunque, la posizione di Firenze rispetto alla gravezza dell'infezione tifoide viene ancora peggiorata, risultando superiore a quella di Milano, e venendo così seconda fra le maggiori delle nostre città, superata soltanto da Palermo.

Ma in questi ultimi 15 anni la morbilità e la mortalità per tifo sono andate diminuendo in modo notevole in tutta Italia in genere e specialmente nelle grandi città, le quali tutte hanno chi più chi meno attuato opere di risanamento, quali provvista di buona acqua potabile, opere di fognatura, sfollamento dei quartieri poveri con conseguente erezione di salubri case popolari, ecc. ecc.

Ora, di pari passo con le altre principali città del Regno, ha visto anche Firenze diminuire la sua morbilità e mortalità per tifo?

È quanto mi sono proposto di vedere col presente studio epidemiologico, sulla scorta dei dati e delle cifre raccolte dall'Ufficio municipale d'igiene.

Il periodo da me studiato comprende l'ultimo decennio, va cioè dal 1894 al 1903.

Per la raccolta dei dati relativi, mi sono servito dei registri dell'Ufficio municipale d'igiene, dal R. Commissario straordinario e dall'Amministrazione a lui succeduta nell'anno testè decorso gentilmente messi a mia disposizione, per quello che riguarda le denunzie dei casi di malattia e di morte per febbre tifoide nella generalità della popolazione; ho pure potuto consultare i registri dell'arcispedale di S. Maria Nuova e stabilimenti da esso dipendenti per i casi in essi trattati nel decennio; dell'ospedale militare divisionale per i casi verificatisi nelle truppe di guarnigione in Firenze; dell'ospedale di S. Giovanni di Dio, nonchè dell'ospizio Israelitico per i casi in essi rispettivamente curati. A tutte le diverse autorità, civili e militari, ai direttori dei vari stabilimenti di cura, al direttore e vice-direttore dell'Ufficio d'igiene, a cui tanto debbo per l'attenzione messa nel facilitarmi, il più che fosse possibile, il lavoro di spoglio e di controllo e nel fornirmi tutte le indicazioni che mi occorrevano, mando da queste pagine un cordiale ringraziamento.

In tutto il decennio 1894-1903 sono stati registrati in Firenze ben 3743 casi di tifo, in questa cifra comprendendo non solo i casi verificatisi nel territorio comunale, ma anche quelli importati dai

comuni limitrofi coll' invio dei tifosi ai vari ospedali, o (per un certo numero esiguo di casi) importati da individui provenienti di fuori colla malattia in periodo di incubazione e scoppiata poi entro pochi giorni dal loro arrivo in città o nel territorio comunale.

Tutti questi casi che per il nostro studio, come è facile comprendere, vanno senz'altro scartati, sommano a 942, sottraendo i quali dalla cifra prima enunciata di 3743, residuano 2801 casi verificatisi in Firenze, città, suburbio e campagna, nel periodo di 10 anni, ossia una media di 280 casi all' anno, con un massimo di 413 per il 1900 e un minimo di 164 nel 1896.

Ripartendo questi 2801 casi per i singoli anni del decennio, si hanno le seguenti cifre:

QUADRO II. — *Morbilità per tifo in cifre assolute* (1).

Anno	1894	Casi registrati	224
Id.	1895	Id.	177
Id.	1896	Id.	164
Id.	1897	Id.	344
Id.	1898	Id.	366
Id.	1899	Id.	282
Id.	1900	Id.	413
Id.	1901	Id.	270
Id.	1902	Id.	300
Id.	1903	Id.	261

Senza alcun dubbio, queste cifre sono molto inferiori al vero per la difficoltà che c' è (e da quanti si sono occupati di statistica sanitaria è stata provata) ad ottenere che tutti i casi vengano dai medici curanti denunziati, come loro ne fa obbligo la legge. Molti e molti casi di tifo vengono passati sotto silenzio dai curanti, o perchè nei primi giorni la diagnosi ne era incerta e poi, passato un certo tempo dall' inizio della malattia, il medico non

(1) Non mi pare superfluo il notare, a proposito di queste cifre, che in conseguenza della mancata denunzia all'Ufficio municipale di molti casi di tifo, esiste necessariamente una sensibile differenza anche fra queste da me raccolte e appurate e quelle che si trovano registrate nel Bollettino sanitario ufficiale del Regno, sempre inferiori alle mie. Soltanto per un anno si verifica un rapporto inverso, e precisamente nel 1898, per il quale il Bollettino ufficiale del Ministero dell' Interno porta per Firenze un numero di casi di tifo di 389, contro soli 298 registrati all'Ufficio municipale; risultandone una differenza in più di 91, ossia di circa $^1/_4$. Ho potuto appurare la ragione di questo fatto, la quale consiste nell'avere attribuito per errore al comune di Firenze, tutti i casi di tifo, costituiti dai malati provenienti da altri comuni e per la massima parte entrati in cura negli ospedali cittadini, e che sommano per l'appunto a 91, secondo le denunzie pervenute all'Ufficio municipale. Questo ho voluto dire per spiegare la differenza esistente tra le mie cifre e quelle del Bollettino ufficiale.

si sente più di denunziare il caso, o perchè la famiglia (e ciò succede spesso) fa pressioni sul curante acchè non faccia la denunzia per risparmiarle delle *noie* per parte dell' Ufficio d'igiene; e così per più motivi la disposizione di legge viene elusa o il numero delle denunzie resta di gran lunga inferiore al vero.

Soltanto quando l'esito della malattia è infausto, allora il curante nella generalità dei casi ne fa la denunzia; ed è per questo che l'unico indice sicuro che ci resta per la statistica, è quello della mortalità. Non è detto bensì che tutti quanti i casi di morte per tifo, nessuno escluso, vengano denunziati per tali; qualcuno passerà, voglio ammettere, anzi passa di sicuro, sotto altro nome; ma certo è che a questo riguardo l'errore si può trascurare e dalle cifre della mortalità si possono trarre delle deduzioni vere ed esatte.

Che quanto ho detto per la morbilità sia purtroppo vero e non esagerato, lo dimostra il seguente fatto: nella elaborazione delle cifre ricavate dai due registri municipali delle denunzie dei casi di malattia e delle denunzie di morte, mi è arrivato semplicemente questo, di trovare per ben due anni su dieci (nel 1894 cioè e nel 1896) denunziato dai varî ospedali cittadini un numero di morti superiore (e una volta non di poco) al numero di tifosi ricoverati stati denunziati. Ora, quello che avviene per gli ospedali, bisogna ragionevolmente ammettere che avvenga pure per i casi cittadini; e a più forte ragione, perchè è appunto nella pratica privata che si verifica a preferenza la mancata denunzia di molti casi, sia che essi insorgano in famiglie ricche e agiate, sia che avvengano in famiglie di più modesta condizione, ma che decorrano benignamente, in modo da non obbligarle al ricovero dell'ammalato all'ospedale.

Dunque le cifre esprimenti la morbilità non si possono ritenere come esatte nè come tali da potersene servire per trarne delle deduzioni in confronto con le cifre esprimenti la mortalità.

Con le sole denunzie, infatti, dei casi di malattia, pervenute all' Ufficio municipale d'igiene, i casi di tifo sarebbero stati in tutto il decennio soltanto 2353 e i morti per tale infezione 617; si avrebbe quindi come mortalità media annua la bella cifra del 26.2 per 100 casi di malattia, con un massimo nientemeno che di 41.4 % e un minimo di 19.1. Ora, si sa che in generale la mortalità specifica per tifo è del 14 % circa; si vede dunque quale alta mortalità si dovrebbe dedurre per Firenze dalle cifre surriferite, e ciò contrariamente a quanto di fatto succede.

E invero, con la sola verifica delle cifre dei casi di malattia e di morte per tifo, eseguita sui registri ospitalieri, ho potuto portare i casi di malattia da 2353 a 2801 e i casi di morte da 617 a 630; ed ecco che con questa verifica parziale il quoziente di mortalità media si abbassa dal 26.2 al 22.5 %, il massimo raggiungendo la cifra di 33.7 %, e con un minimo di 17.4; donde il notevole abbassamento della mortalità del 3.7 %.

Di quanto questo quoziente non si abbasserebbe ancora se, come ho potuto fare per i casi ospitalizzati, avessi potuto eseguire un'accurata verifica dei casi cittadini, tutti comprendendoli nella statistica?

Studiando il movimento del tifo negli ospedali, vedremo infatti ancora diminuire di circa il 3 % il quoziente di mortalità, per avvicinarsi maggiormente alla media del 14 %.

E del resto. se ammettiamo anche per Firenze una mortalità media per tifo del 15 per 100 malati, dato che nel decennio sono morti per tale malattia 630 individui, verremmo ad avere una media di 420 casi di tifo all'anno, cifra ben superiore a quella che ci è fornita dalle denunzie e registrazioni di casi potute raccogliere, che rappresenterebbero solamente i $^{2}/_{3}$ del numero reale.

Voglio però qui notare che, nonostante questo vizio di cui sono inquinate le cifre di morbilità, io ho voluto a bella posta registrarle nel prospetto precedente, perchè in seguito mi saranno esse pure di una qualche utilità per istituire dei confronti interessanti.

Se si prendono invece le cifre riflettenti la morbilità e mortalità degli ospedali, si possono ottenere dei valori ben paragonabili fra di loro, perchè negli ospedali ogni caso di tifo viene registrato senza fallo (anche se per un qualunque motivo non sarà denunziato all'Ufficio sanitario), non essendoci nessun interesse ad occultarlo.

Per quello però che ho detto sopra riguardo al rapporto paradossale da me osservato in due annate su dieci, le cifre relative ai casi ospitalizzati raccolte all'Ufficio municipale d'igiene non potrebbero davvero servire per ricavarne delle deduzioni di nessuna specie; ho dovuto quindi indirizzarmi alla fonte e consultare perciò i registri ospedalieri del decennio, ricavando direttamente da essi tutti i casi di tifo entrati in cura negli ospedali, e uscitine o per guarigione o per morte.

Da queste cifre ho ottenuto come quoziente di mortalità specifica media annua ospitaliera per tifo la cifra di 19. 6, che, se pure notevolmente più alta della media universalmente osservata del 14-15 %, vi si avvicina in modo sensibile.

Ed è ben naturale, del resto, che la mortalità ospitaliera per tifo risulti più alta della media normale, per il fatto che all'ospedale vengono in generale ricoverati i casi che presentano maggior gravità, i quali quindi dànno necessariamente una mortalità ospitaliera maggiore di quella che si verifica nella totalità della popolazione, in cui ai casi gravi vanno uniti tutti quelli che decorrono più miti e leggieri.

Ma, senza dilungarmi qui più oltre nell'esame delle cifre ricavate dallo spoglio dei registri ospitalieri (esame che troverà il suo posto più innanzi), mi limiterò a ricordare la nota legge del Pettenkofer, per cui la morbilità e la mortalità stanno fra loro in proporzione diretta e il movimento ospitaliero rispecchia fedelmente il movimento totale cittadino della malattia.

Se questa legge, dimostrata applicabile per tante altre città da molti lavori di epidemiologia, si avveri anche per Firenze, avremo dallo studio comparativo delle due curve, cittadina e ospitaliera, un controllo sui dati relativi al movimento della infezione tifica nella città.

***

E veniamo anzitutto allo studio del movimento del tifo nella totalità della cittadinanza.

In tutto il decennio sono morte in Firenze in seguito all'infezione tifica 851 persone, in questa cifra venendo compresi tanto i residenti abituali od occasionali, quanto i malati provenienti da altri comuni per esser presi in cura nei diversi ospedali cittadini, nonchè gli individui ammalatisi fuori del comune e tornati alle loro case portando l'infezione dal difuori.

Sottraendo da questa cifra globale quelli dei casi di morte che per il nostro studio non vanno presi in considerazione, quali sarebbero appunto i morti provenienti da altri comuni con l'infezione tifosa già in atto altrove contratta, e che ammontano in tutto alla cifra di 221, residuano 630 casi di morte per tifo nel decennio 1894-1903, ossia una media di 63 morti all'anno.

Il quadro seguente dà le cifre assolute ripartite per anno e la proporzione per 10,000 abitanti:

QUADRO III. — *Mortalità per tifo in Firenze nel decennio 1894-903.*

ANNI	Popolazione presente ai principio di ogni anno, compresa la guarnigione	Morti per tifo	
		Cifre assolute	Per 10,000 abitanti
1894	188,907	57	3.02
1895	190,797	50	2.62
1896	192,482	55	2.86
1897	194,631	91	4.67
1898	196,865	65	3.30
1899	199,080	67	3.36
1900	201,925	72	3.56
1901	205,422	53	2.58
1902	208,748	59	2.82
1903	212,661	61	2.87
Media del decennio	**199,152**	**63**	**3.16**

Da questo quadro appare chiara la divisione del decennio studiato in tre periodi, due di minimo e uno di massimo: nel primo triennio si ha un primo minimo; nei quattro anni seguenti un periodo di massimo e negli ultimi tre un secondo periodo minimo, di poco superiore al primo.

Traducendo in una tavola grafica le cifre annue surriportate, si mettono anche più in evidenza queste oscillazioni periodiche:

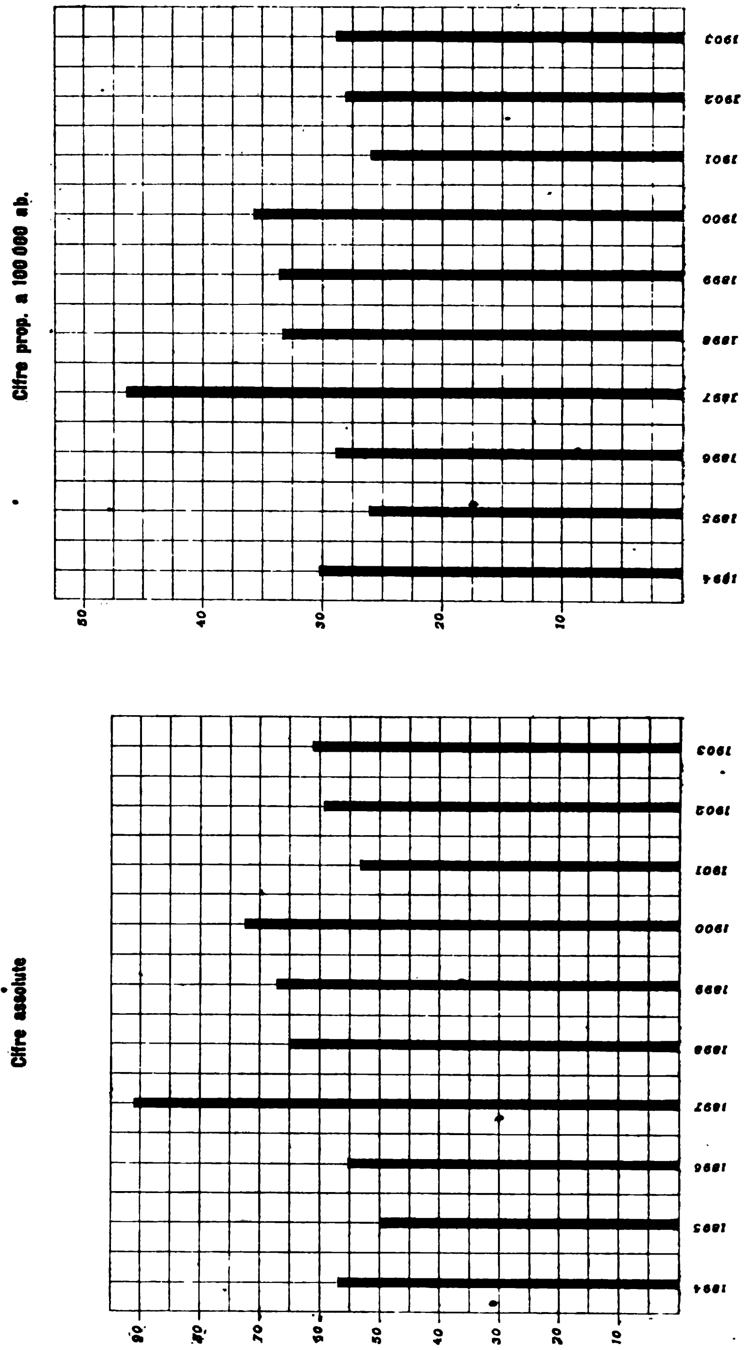


Fig. 1. — Mortalità totale per tifo in Firenze nel decennio 1894-1903, in cifre assolute e relative a 100,000 abitanti.

Nel decennio abbiamo avuto un minimo assoluto nel 1895 con 50 morti per tifo, pari a 2. 62 per 10,000 abitanti, e un massimo di 91 nel 1897, pari a 4. 67 per 10,000 abitanti; la media annua è di 3. 16.

Come si vede, il miglioramento conseguito da Firenze riguardo alla febbre tifoide, dal decennio precedente a quest'ultimo, è considerevole; essendo la mortalità ridotta di oltre la metà, da 7. 88 cioè a 3. 16 per 10,000 abitanti. Ed anche se si considerano i massimi e minimi dei due decenni, si nota il grande miglioramento dell'ultimo rispetto al primo: in questo la mortalità oscillò da un minimo di 5. 4 nel 1888 ad un massimo di 10. 9 nel 1886; nel decennio ultimo, invece, un tal massimo è stato lasciato ben addietro, non essendosi raggiunta neanche la metà di tal cifra (4. 67 : 10. 9), e il minimo avutosi è alla sua volta meno che la metà del minimo del decennio precedente (2. 26 : 5. 4).

***

Vediamo ora il movimento del tifo negli ospedali cittadini, prendendo in esame e la morbilità e la mortalità.

I casi di tifo curati nei varî ospedali in tutto il decennio sommano a 2200, dai quali detraendo 878 casi provenienti dal difuori del comune di Firenze, restano 1322 da assegnarsi alla città e territorio comunale.

Su questi 2200 tifosi ricoverati si verificarono 481 casi di morte, di cui 260 sono quelli da assegnarsi a Firenze.

Riunendo i singoli dati annui relativi alla morbilità e mortalità di tifo negli ospedali, abbiamo il seguente

Quadro IV. — *Movimento del tifo negli ospedali cittadini.*

ANNI	Casi	Morti	Casi	Morti
	Cifre assolute		per 10,000 abitanti	
1894.	72	22	3.81	1.16
1895.	63	17	3.30	0.89
1896.	73	29	3.79	1.50
1897.	173	37	8.88	1.90
1898.	204	27	10.36	1.37
1899.	164	34	8.23	1.70
1900.	187	33	9.26	1.63
1901.	135	23	6.57	1.12
1902.	130	21	6.22	1.00
1903.	121	17	5.68	0.89
Media del decennio	**132.2**	**26.0**	**6.64**	**1.30**

Questo quadro ci mostra esso pure le oscillazioni periodiche già svelateci dal quadro III e, naturalmente, non solo per quanto riflette la mortalità, ma anchè riguardo alla morbilità, venendo così anche per Firenze confermata la enunciata legge del Pettenkofer.

Abbiamo, infatti, un primo periodo minimo nel triennio 1894-96; poi a un tratto si ha un forte rialzo che costituisce un periodo quadriennale di massimo, e finalmente un secondo periodo di minimo, nell'ultimo triennio.

Questo secondo periodo minimo poi, mentre è leggermente inferiore al primo per ciò che riguarda la mortalità (61 : 68 +), contrariamente a quello che si è notato nella curva cittadina che è maggiore (173 : 162 +), si mostra invece notevolmente superiore per quello che concerne la mortalità (386 tifosi ammessi nel 1901-903 contro soli 208 nel triennio 1894-96).

Dall'esame comparativo delle cifre dei due quadri IV e V, possiamo renderci ragione di queste differenze nella mortalità e morbilità, differenze che debbono attribuirsi alla maggiore affluenza di tifosi, anche leggieri, all'ospedale, anzichè ad una maggiore beni-

gnità della malattia nel secondo periodo del decennio studiato, come potrebbe far credere il presupposto generalmente ammesso e verificato come esatto, che all'ospedale cercano ricovero e cura solamente i casi più gravi.

Esaminando il quadro IV, vediamo nell'ultima colonna che la mortalità ospitaliera, riferita a 10,000 abitanti, si mantiene nell'ultimo triennio eguale a quella verificatasi nel primo; dunque, se la mortalità non è diminuita, mentre i casi ricoverati negli ospedali sono raddoppiati dai primi agli ultimi tre anni, ciò potrebbe significare: o che negli ultimi anni appunto l'affluenza dei tifosi negli ospedali è stata molto maggiore e non più limitata ai casi più gravi, che davano un così alto quoziente di mortalità, quale ci mostra il quadro V nell'ultima sua colonna; oppure che effettivamente l'intensità della infezione si è ridotta dal primo al secondo triennio di circa la metà. A sostegno della prima ipotesi abbiamo la mortalità cittadina, la quale sta pure a provarci che la infezione tifica non ha scemato in misura apprezzabile nella sua intensità nel decennio, essendo i quozienti di mortalità cittadina nell'ultimo triennio presso a poco eguali a quelli ottenuti nel primo, come ci mostra il quadro III.

Anche l'epoca del minimo assoluto verificatosi in tutto il decennio coincide con quella della curva cittadina, cioè esso si è verificato nel 1895 con 17 casi di morte in cifre assolute, pari al 0.89 per 10,000 abitanti, in corrispondenza con un minimo di 63 casi di malattia ricoverati in tutto l'anno nei varî ospedali; e un secondo minimo perfettamente eguale si è avuto anche nel 1903. Il massimo pure delle morti cade nello stesso anno 1897 del massimo delle morti verificatosi per tutto il territorio comunale; mentre si nota una discordanza per quello che concerne il massimo dei casi di tifo ricoverati, il quale si è verificato nell'anno successivo e con una cifra non poco superiore a quella del 1897, a cui però fa riscontro una mortalità notevolmente inferiore.

Rappresentando graficamente l'andamento del tifo negli ospedali con le due curve della morbilità e mortalità in confronto con la curva della mortalità cittadina, possiamo vedere con tutta evidenza e le oscillazioni annuali e la assai fedele corrispondenza delle tre curve.

L'esame della curva di morbilità ospitaliera ci dimostra poi anche, oltre le grandi oscillazioni periodiche, delle variazioni annuali di diversa entità e irregolari nella loro distribuzione.

Studiando più da vicino le tre curve, possiamo osservare che ad un massimo di morbilità ospitaliera nel 1898 non corrisponde una

proporzionale elevazione delle due curve di mortalità, ospitaliera e cittadina, ma anzi si ha in esse un notevole abbassamento dal punto raggiunto nell'anno precedente; nel 1900 pure, ad una di-

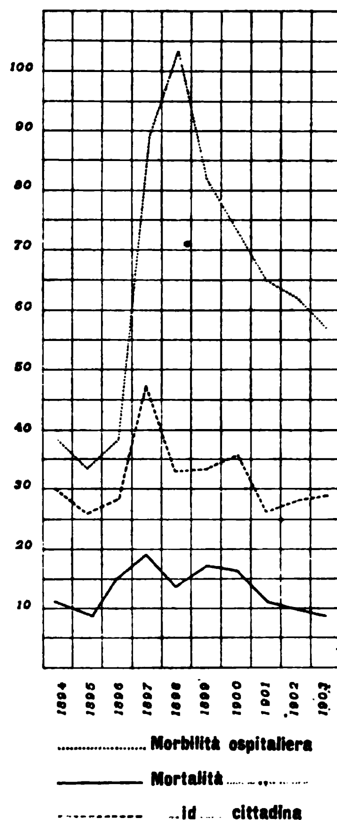


Fig. 2. — Morbilità e mortalità ospitaliera e mortalità cittadina per tifo nel decennio 1894-1903, calcolata per 100,000 abitanti

screta elevazione della curva di morbilità non corrisponde un eguale aumento della mortalità; e ciò si può spiegare colla diversa gravezza dell'infezione, per cui si sarebbe avuta nel 1898, in ispecial modo, e poi nel 1900 in minor misura, una infezione tifica estesa, ma di relativa mitezza.

E questo fatto viene confermato anche dal comportamento del tifo nel 1898 in tutti i comuni limitrofi, che hanno dato un molto maggior contributo di tifosi agli ospedali cittadini, però con una mortalità sempre inferiore a quella del 1897: e infatti, mentre in quest'ultimo anno i tifosi ricoverati in Firenze, provenienti dai

vicini comuni, furono soltanto 68 e fornirono 21 caso di morte, ossia il 30. 8 %, nel 1898 ne vennero ricoverati ben 239 e di essi ne morirono 51, ossia il 21. 3 %.

Lo studio della mortalità negli ospedali ci dà una media annua dell'1. 3 per 10,000 abitanti e un quoziente di mortalità specifica del 19. 6 per 100 tifosi ammessi, con le seguenti oscillazioni annue:

QUADRO V. — *Quoziente di mortalità specifica nei ricoverati negli ospedali.*

ANNI	Tifosi ammessi negli ospedali	Morti	Morti %
1894.	72	22	30. 5
1895.	63	17	26. 9
1896.	73	29	39. 7
1897.	173	37	21. 4
1898.	204	27	13. 2
1899.	164	34	20. 7
1900.	187	33	17. 6
1901.	135	23	17. 0
1902.	130	21	16. 1
1903.	121	17	14. 0
Media del decennio . . .	**132. 2**	**26. 0**	**19. 6**

Da questo quadro risulterebbe, dunque, una mortalità media negli ospedali notevolmente superiore alla media del 14 % circa dei casi (per Milano il Bordoni-Uffreduzzi porta una mortalità media ospitaliera del 13. 2 % nel periodo 1889-95).

Ma questo quoziente del 19. 6 % è ancora così alto, perchè nei primi anni, specialmente, del periodo studiato, gli ospedali non davano ricovero che ai casi più gravi, la popolazione essendo evidentemente più aliena che non in seguito dal ricoverare gli ammalati; e ciò lo abbiamo visto più sopra e dimostrato con le cifre. Se, infatti, scindiamo il decennio in due periodi eguali, troviamo

per il primo quinquennio un quoziente di mortalità eguale a 22. 5 % e per il secondo un quoziente di non più che 17. 3 %; nel primo triennio poi, che abbiamo veduto ricoverare un numero di tifosi eguale alla metà dei ricoverati nell'ultimo, il quoziente di mortalità è del 32. 6 %, mentre scende a meno della metà negli ultimi tre anni, ossia al 15. 8 %, approssimandosi così alla media.

Dal confronto poi fra il totale dei ricoverati per malattie comuni in genere, nell'Ospedale di Santa Maria Nuova e dipendenze, col numero dei tifosi forniti dal comune, risulta che questi sono stati in media il 13 ‰ circa (da un minimo di 6. 83 nel 1895 al massimo di 19. 29 nel 1898, con una media del 12. 85), e il rapporto esistente fra il totale dei morti forniti dai ricoverati per malattie comuni e i morti di tifo, dà per il decennio una media annua del 24. 63 ‰, con un minimo, sempre nel 1895, eguale a 15. 34 e con un massimo di 38. 59 nel 1897; e ciò conformemente a quello che ho notato più sopra, sulla diversa gravezza dell'infezione nei diversi anni.

Tali cifre sono messe in evidenza dal seguente

QUADRO VI. — *Malati e morti comuni in genere e malati e morti di tifo nell'Ospedale di Santa Maria Nuova e dipendenze.*

ANNI	Totale ammessi	Tifosi	Tifosi per 1000 ammessi	Totale morti	Morti per tifo	Morti di tifo per 1000 morti in genere
1894.	7507	66	8. 79	882	22	24. 94
1895.	7752	53	6 83	978	15	15. 34
1896.	7753	64	8. 25	834	27	32. 37
1897.	8318	148	17. 79	881	34	38. 59
1898.	8966	173	19. 29	876	23	26. 25
1899.	9020	136	15. 08	924	30	32. 47
1900.	10057	172	17. 10	1018	25	22. 56
1901.	10221	129	12. 62	993	22	22. 15
1902.	11109	125	11. 25	1013	20	19. 74
1903.	11137	115	10. 32	1099	16	14. 56
Media del decennio	**9184. 0**	**118. 1**	**12. 86**	**949. 8**	**23. 4**	**24. 63**

Si noti che nelle cifre esprimenti il numero totale dei ricoverati e dei morti nell'Arcispedale di Santa Maria Nuova sono compresi tutti gli ammessi e i deceduti, senza riguardo a provenienza, se dal comune di Firenze o di fuori.

Questo quadro, come sopra ho accennato, è stato ricavato dal movimento del solo Arcispedale di Santa Maria Nuova, perchè di esso soltanto mi è stato possibile avere con precisione il numero degli entrati e il numero dei morti; degli altri ospedali civili cittadini non ho potuto avere il movimento del decennio da me studiato, e, del resto, i casi di tifo in essi rispettivamente ricoverati mi risultano pochissimi e quindi trascurabili; per quello che concerne l'Ospedale militare della nostra Divisione, non esistono più i registri dei primi quattro anni del periodo da me studiato e quindi non avrei potuto fare lo spoglio del totale degli entrati in cura (1), senza poi contare che lo studio della morbilità e mortalità per tifo della truppa di guarnigione può trovare il suo trattamento a parte, sceverando qui le cifre ad esse relative da quelle concernenti la popolazione civile. Soltanto nel calcolo della mortalità globale per tifo ho dovuto includere anche i casi avvenuti nella guarnigione, perchè, avendo trovato nelle cifre annuali della popolazione presente in Firenze compresa anche la guarnigione, senza poterne avere l'effettivo, nonostante le ricerche eseguite alla nostra Divisione militare e all'Ufficio di anagrafe e statistica del Comune, non potevo alterare il rapporto fra popolazione e mortalità, escludendo i morti della guarnigione; sebbene le cifre esprimenti la mortalità militare per tifo, in confronto alla stessa mortalità per Firenze, in generale siano piuttosto basse (su 630 morti di tifo nel decennio vi furono 21 morti nella guarnigione, ossia il 3.3 per 100 morti di tifo nella totalità della popolazione civile e militare).

Che, del resto, lo studio così limitato al solo movimento dell'Arcispedale di Santa Maria Nuova fornisca un concetto perfettamente esatto dell'andamento dell'infezione tifica nella città, oltre che da quanto ho detto precedentemente, risulta anche in modo assai chiaro dallo studio comparativo delle cifre esprimenti la morbilità e mortalità globale per tifo della città e dell'intero territorio comunale, così privata come ospitaliera, tanto civile quanto militare; come lo dimostra l'esame dei dati che esprimono la ripartizione dei casi di malattia e di morte per tifo nei vari quartieri della città.

Per ottenere questi dati io ho adottato la divisione della città e dell'intero territorio comunale in distretti medici. Questi sommano a 18, di cui 10 urbani e 8 suburbani, ripartendo così la città e il territorio del comune

(1) La mortalità generale militare ho potuto ricavare dalla recentissima pubblicazione: *Annuario statistico del Comune di Firenze*, 1903, anno I, uscito in luce sul finire del 1904.

in tante zone abbastanza bene delimitate e di non troppa estensione. Ed è stata appunto questa considerazione che mi ha fatto preferire tale divisione a quella in sezioni, che sono solamente quattro, e quella negli antichi quartieri, pure in numero di quattro, e per il mio scopo troppo arbitrariamente delimitati.

Distribuendo adunque i singoli casi di tifo stati ricoverati nell'Arcispedale di Santa Maria Nuova e le morti per tifo in esso avvenute per i diversi distretti di provenienza dei malati, si hanno i risultati seguenti:

QUADRO VII. — *Distribuzione dei casi di malattia e di morte ospitalizzati per distretti medici.*

	Distretti medici																		Non potuti assegnare	Totali
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Tifosi ricoverati	143	66	127	117	88	80	36	83	100	70	38	55	38	16	9	43	39	33	11	1,192
Morti	23	11	24	22	16	13	7	20	24	15	13	13	8	5	3	7	3	7	2	236

Se si istituisce un confronto fra queste cifre e quelle esprimenti la morbilità e mortalità civile per tifo cittadina totale, si ha il seguente quadro, che mostra la grande corrispondenza fra l'andamento della infezione nella città in genere e nell'ospedale:

QUADRO VIII. — *Morbilità e mortalità cittadina e òspitaliera* (*cifre assolute e relative*), *divise per distretti medici.*

Cifre assolute.

	Distretti medici																		Non potuti assegnare	Totali
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Morbilità civile totale (*a*).	268	143	245	275	165	185	135	133	179	115	162	128	93	62	18	90	133	133	17	2,679
Id. cittadina (*b*) . .	125	77	118	158	77	105	99	50	79	45	124	73	55	46	9	47	94	100	6	1,487
Id. ospitaliera. . .	143	66	127	117	88	80	36	83	100	70	38	55	38	16	9	43	39	33	11	1,192
Mortalità civile totale (*a*).	60	29	53	61	34	45	45	35	51	29	37	29	23	14	4	15	16	24	4	609
Id. cittadina (*b*). .	37	18	29	38	18	32	38	16	27	14	24	16	15	9	1	8	13	17	2	372
Id. ospitaliera. . .	23	11	24	23	16	13	7	20	24	15	13	13	8	5	3	7	3	7	2	237

Cifre relative a 1000 casi di malattia e di morte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Non potuti assegnare	Totali
Morbilità civile totale (*a*).	100.0	53.4	91.4	102.6	61.6	69.0	50.4	49.6	66.8	42.9	60.4	47.7	34.7	23.0	6.7	33.6	49.6	49.6	5.9	..
Id. cittadina (*b*). .	84.1	51.8	79.4	106.3	51.8	70.6	66.6	33.6	53.1	30.3	83.4	49.1	37.0	30.9	6.0	31.6	63.2	67.3	3.3	..
Id. ospitaliera. . .	119.9	55.3	106.5	98.1	73.8	67.1	30.2	69.5	83.8	58.7	31.8	46.1	31.8	13.4	7.5	36.0	32.7	27.6	9.2	..
Mortalità civile totale (*a*).	99.1	47.6	87.6	100.8	56.1	74.3	73.8	59.5	84.2	47.9	61.1	47.9	38.0	23.1	6.6	24.7	26.4	39.6	6.5	..
Id. cittadina (*b*) . .	99.4	48.4	77.9	102.1	48.4	86.0	102.1	43.0	72.5	37.6	64.5	43.0	40.3	24.2	2.7	21.5	34.9	45.5	5.4	..
Id. ospitaliera. . .	97.0	46.4	101.3	97.0	67.5	54.8	29.5	84.4	101.3	63.3	54.8	54.8	33.7	21.1	12.6	29.5	12.6	29.5	8.4	..

(*a*) Privata cioè e ospitaliera. — (*b*) Soltanto la privata, esclusi cioè tutti i casi ospitalizzati.

In questo quadro ho registrato la morbilità e mortalità civile cittadina, sia in totale, quale risulta dai casi conosciuti curati nella pratica privata e da quelli ricoverati all'Arcispedale di Santa Maria Nuova, sia quella parziale risultante dai semplici casi della pratica privata non ospitalizzati; e, naturalmente, per quello che riguarda la morbilità, si possono notare nei valori relativi delle differenze abbastanza forti tra le cifre della seconda riga e quelle della terza, a cagione della mancata denuncia di tanta parte dei casi privati, che evidentemente si verifica dove più e dove meno. Se, invece, mettiamo in confronto le cifre della morbilità civile totale con quelle della sola morbilità ospitaliera, tali differenze, pure restando, si attenuano in linea generale, venendo così in parte ad essere compensato l'errore sopra accennato dai dati ospitalieri, esattissimi, perchè riscontrati e controllati sui registri relativi di Santa Maria Nuova.

Se, ora, sulla scorta delle cifre sopra registrate costruiamo le curve relative, possiamo mettere anche meglio in chiaro la corrispondenza dell'una coll'altra, anche se ci serviamo dei valori più aberranti della seconda serie (morbilità cittadina privata esclusiva). Riguardo poi alla mortalità, le differenze sono anche minori. Ciò adunque torna a conferma della legge del Pettenkofer.

I due grafici alla pag. di contro riproducono le relative curve.

Ed è per questa ragione della corrispondenza della curva di morbilità cittadina con quella della morbilità ospitaliera che qui mi sono servito pure delle cifre riflettenti la prima, perchè esse mi offrono la dimostrazione della esattezza del criterio che ho adottato per la ripartizione dei casi di malattia e di morte per tifo nelle singole frazioni della città corrispondenti ai distretti medici comunali.

La corrispondenza delle due curve, cittadina e ospitaliera, si verifica specialmente in grado maggiore per i 10 distretti urbani; ed è questo appunto che ha per me maggiore importanza per la costruzione dei cartogrammi relativi alla morbilità e mortalità per tifo nel perimetro della città.

L'unica discrepanza, veramente notevole, e che non può essere passata sotto silenzio, si osserva fra le due curve di mortalità (fig. 4ª) nel 7° distretto, il quale risulta così essere l'unico che fornisca una mortalità ospitaliera per tifo di molto inferiore a quella cittadina, così globale come privata sola, senza dubbio dipendentemente dal fatto che la sua popolazione ricorre poco all'ospedale, ma tiene e cura i suoi ammalati a domicilio, e non perchè abbia una tanto minore morbilità e mortalità in proporzione degli altri distretti urbani. E questo fatto potrebbe forse trovare la sua spiegazione nel minor numero di famiglie povere esistenti in questo distretto, impossibilitate a curare in casa i propri ammalati.

Per fare la topografia nosologica del tifo, ottenuta con le cifre surriportate la ripartizione dei casi di malattia e di morte nei vari distretti, ossia uno dei termini del rapporto, mi occorreva l'altro

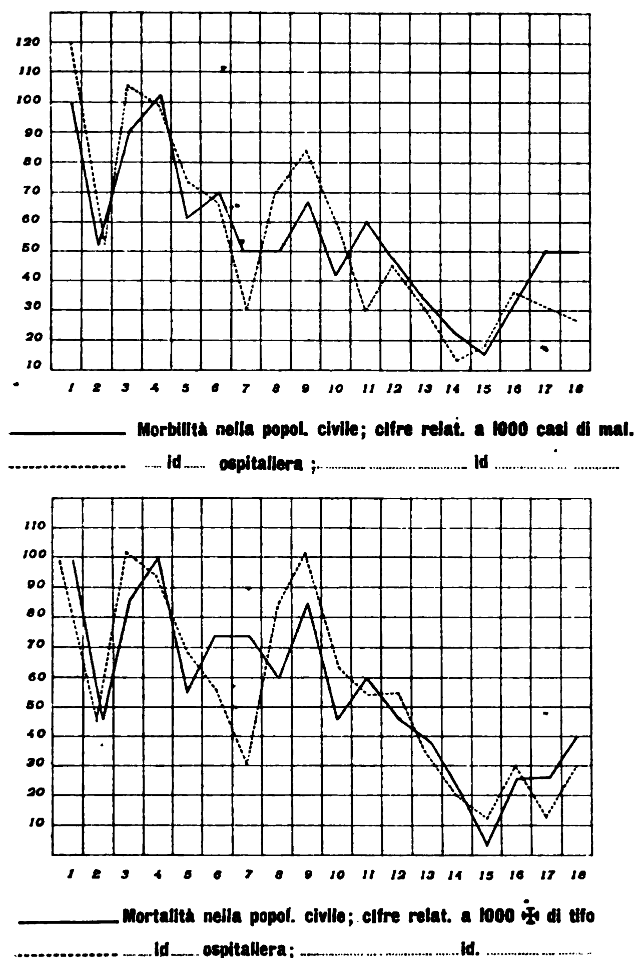


Fig. 3 e 4. — Morbilità e mortalità cittadina e ospitaliera in cifre proporzionali a 1000 casi di malattia o di morte, ripartita per distretti medici.

termine (popolazione), per avere le percentuali necessarie per costruire i cartógrammi suddetti della morbilità e mortalità per tifo in Firenze.

Per questo scopo, sarebbe stato desiderabile che avessi potuto eseguirli, prendendo per base il rapporto fra casi di malattia e casi di morte per tifo da un lato e la popolazione di ogni singolo distretto dall'altro; ma ciò mi è

stato impossibile, non avendosi all'ufficio di anagrafe e statistica municipale nessun dato in proposito, solo essendosi partiti (come mi fu detto) da un numero press'a poco eguale di famiglie povere da assegnarsi a ciascun medico condotto all'atto della istituzione dei distretti medici comunali; in seguito non si è più tenuto nessun conto delle variazioni.

A più forte ragione mancano dati relativi alla popolazione agiata di ciascun distretto; e manca pure qualunque dato per tutti gli anni del decennio da me studiato sulla popolazione delle sezioni, in cui la città è divisa, ad eccezione dell'anno 1901, in cui tale computo fu fatto allora per la prima volta non soltanto per sezioni e mandamenti, ma anche per le singole parrocchie del comune; ma questi dati, se pur mi serviranno in seguito, come vedremo, per istituire alcuni confronti, in cui sono sufficienti dati approssimativi, non potevano assolutamente essere utilizzati con profitto e in modo rispondente al vero per lo studio che ora ci occupa.

Non mi restava dunque che ricorrere al movimento generale ospitaliero, basandomi sulla legge del Pettenkofer, che, se dimostrata applicabile anche a Firenze, come si è visto più sopra, per il movimento del tifo in generale, doveva necessariamente dare risultati pure attendibili e veritieri per singole frazioni della città.

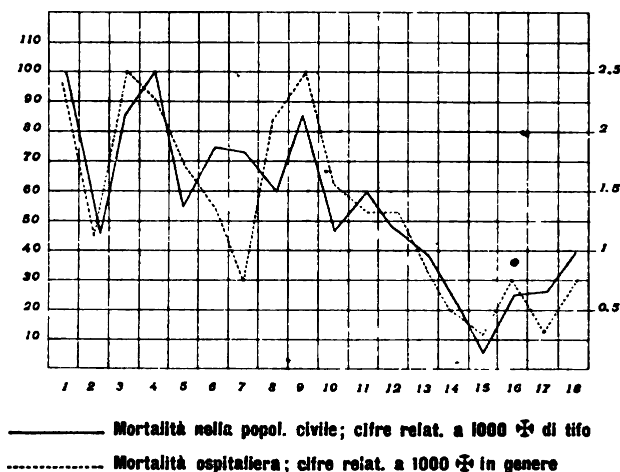
Infatti, il rapporto fra il numero totale degli ammalati comuni in genere e i tifosi entrati in cura all'arcispedale di Santa Maria Nuova, e il rapporto fra il numero totale dei morti per malattie comuni in genere e i morti per tifo (v. quadro VI), ragguagliati a 1000, per ogni singolo distretto hanno dato i seguenti valori che raccolgo nel

Quadro IX. — *Rapporto fra malati e morti comuni in genere e malati e morti di tifo ospitalizzati.*

(Cifre proporzionali a 1000 malati e morti comuni).

	Distretti urbani										Distretti suburbani							
	Distretti medici																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tifosi ammessi. .	1.56	0.72	1.38	1.27	0.96	0.87	0.39	0.90	1.09	0.76	0.41	0.59	0.41	0.17	0.09	0.47	0.42	0.36
	Media annua distretti urbani = 9.92										Media annua distretti suburbani = 2.94							
	Media annua comune = 12.86																	
Tifosi morti. . .	2.42	1.16	2.52	2.31	1.68	1.37	0.74	2.10	2.52	1.58	1.37	1.37	0.84	0.52	0.31	0.74	0.31	0.74
	Media annua distretti urbani = 18.40										Media annua distretti suburbani = 6.20							
	Media annua comune = 24.60																	

Queste cifre sono in perfetto accordo con quelle del quadro precedente e la corrispondenza si dimostra perfetta se si costruisce con esse (ad esempio quelle esprimenti la mortalità) una curva da mettere in rapporto con la curva della mortalità cittadina esprimente la proporzione di morti su 1000 morti di tifo. per ogni singolo distretto. È quello che mostrano appunto i grafici seguenti:



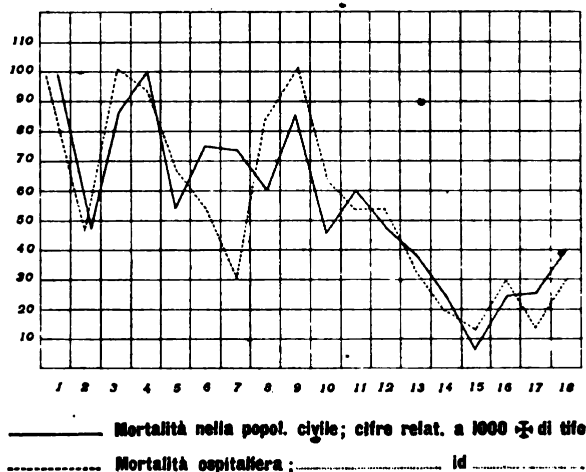


Fig. 5 e 6. — Rapporto fra mortalità cittadina e ospitaliera per tifo, ripartita per distretti medici.

Come la figura dimostra, la curva della mortalità per tifo proporzionale a 1000 morti in genere di qualunque delle malattie comuni, deceduti nell'arcispedale di Santa Maria Nuova (senza riguardo

a provenienza degli ammessi), tracciata ad una scala ingrandita di 40 volte rispetto all'altra curva, riproduce esattamente, salvo differenze minime, la curva della mortalità ospitaliera proporzionale a 1000 morti di tifo, tanto da potersi le due curve sovrapporre, in modo, si può dire, perfetto.

Analogamente si potrebbe dimostrare con la costruzione di un altro grafico la corrispondenza delle due curve di morbilità, la curva di morbilità proporzionale a 1000 casi di tifo ricoverati all'ospedale e quella dei casi di tifo relativi a 1000 malati comuni ospitalizzati. Queste due curve si sovrappongono anch'esse quasi esattamente, se si ingrandisca in modo adeguato la scala della seconda rispetto alla prima.

Potevo però anche fare il rapporto fra mortalità generale per Firenze e mortalità per tifo, e ricavarne le percentuali per i singoli distretti, in cui il territorio comunale è diviso. Ma, per il cartogramma della morbilità questo rapporto mi manca, essendo il primo termine (morbilità generale) naturalmente impossibile ad aversi, il secondo (morbilità cittadina per tifo, dato che abbiamo a disposizione) non rispondendo al vero per la mancata denunzia di molti casi; quindi per costruire i due cartogrammi della morbilità e della mortalità, ben paragonabili fra di loro per l'identità delle basi che hanno servito a costruirli, ho dovuto adottare la morbilità e la mortalità generale ospitaliera paragonate alla morbilità e mortalità specifiche per tifo.

Del resto, non è inutile esaminare i risultati che si ottengono, facendo appunto il rapporto fra mortalità generale cittadina e mortalità per tifo. Perchè, se anche per Firenze è applicabile la legge del Pettenkofer, dato che esiste tra morbilità e mortalità ospitaliera e morbilità e mortalità cittadina un rapporto tale che permette dal comportamento delle prime di giudicare del movimento dell'infezione nella città in generale, lo stesso rapporto dovrà esistere fra mortalità generale cittadina e mortalità cittadina per tifo.

Il rapporto fra mortalità generale e mortalità cittadina per tifo è stato annualmente il seguente:

QUADRO X. — *Rapporto fra mortalità generale e mortalità cittadina per tifo.*

ANNI	Mortalità generale (esclusa la guarnigione)	Mortalità per tifo	Morti di tifo per 1000 morti in genere
1894.	4,714	57	12.0
1895.	4,531	50	10.5
1896.	4,382	55	12.3
1897.	4,668	91	19.0
1898.	4,438	65	13.7
1899.	4,494	67	14.2
1900.	4,920	72	13.4
1901.	4,674	53	11.1
1902.	4,722	59	12.2
1903.	4,799	61	12.5
Media del decennio . . .	**4,634.2**	**60.9**	**13.1**

Dal confronto di questi quozienti annui con quelli fra mortalità generale e mortalità tifica dell'arcispedale di Santa Maria Nuova (v. quadro VI), si vede già una corrispondenza abbastanza fedele fra i valori annui dei due movimenti, cittadino e ospitaliero; corrispondenza resa anche più evidente dalla costruzione delle rispettive curve, come dimostra il seguente grafico.

Se qui si tien conto che nella mortalità generale cittadina sono compresi tutti i casi di morte verificatisi nel comune annualmente, senza riguardo ad appartenenza, per qualunque causa, morbosa od accidentale, compresi i nati e morti, i militari, ecc., mentre la mortalità ospitaliera riporta soltanto, come ho detto più sopra, i casi di morte avvenuti nelle infermerie di Santa Maria Nuova e nella sezione pediatrica, dove sono ricoverati i soli malati comuni (esclusi quindi i cronici, la maternità, i tubercolotici, ecc.), si avrà la spiegazione delle differenze esistenti fra le due curve e del forte distacco che corre fra l'una e l'altra.

Se, ora, prendiamo le cifre totali del decennio della mortalità cittadina e ospitaliera per tifo e le ripartiamo per i singoli distretti, mettendole in rapporto con la mortalità generale civile ragguagliata a 1000, abbiamo il seguente

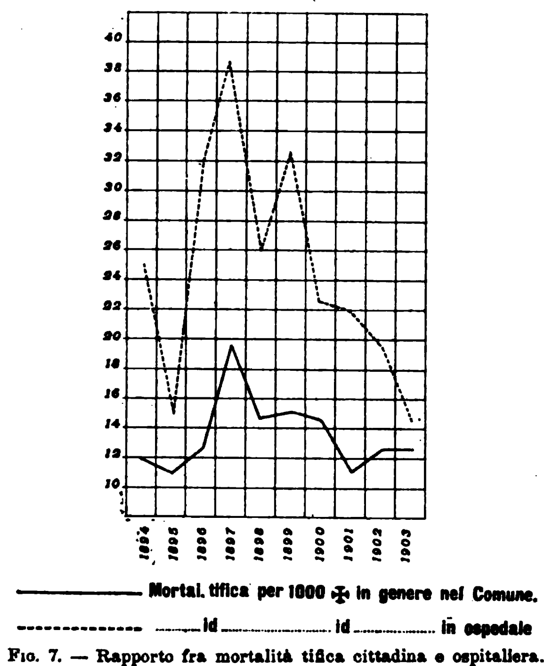


Fig. 7. — Rapporto fra mortalità tifica cittadina e ospitaliera.

Quadro XI. — *Rapporto fra mortalità generale civile e mortalità cittadina e ospitaliera per tifo.*

(In cifre proporzionali a 1000 morti in genere).

	Distretti medici																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Su 1000 morti in genere in città, morti per tifo in S. M. Nuova.	0.49	0.23	0.51	0.47	0.34	0.27	0.15	0.42	0.51	0.32	0.28	0.28	0.17	0.10	0.06	0.15	0.06	0.15
Morti per tifo nella città intera.	1.29	0.62	1.14	1.31	0.73	0.97	0.97	0.77	1.10	0.62	0.79	0.62	0.49	0.30	0.08	0.32	0.34	0.51

Dall'esame di questo quadro, si vede già la grande corrispondenza che esiste fra le cifre delle due serie, e ancor più evidentemente lo dimostra la costruzione delle curve rispettive (fig. 8ª e 9ª); costruzione che viene a riprodurre con piccole varianti le curve della mortalità nella popolazione civile e della mortalità ospitaliera

proporzionali a 1000 morti di tifo, curve già figurate (v. fig. 5ª e 6ª) e discusse più sopra.

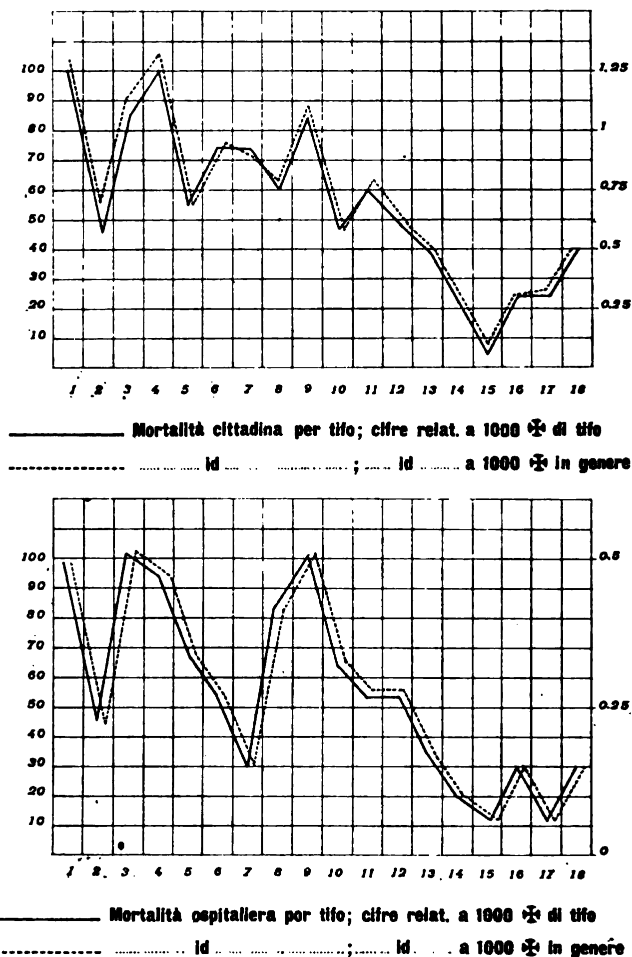


Fig. 8 e 9. — Mortalità cittadina e ospitaliera per tifo in rapporto alla mortalità generale e tifica, ripartita per distretti medici.

Resta adunque ancora una volta provato e per altra via, che il rapporto da me scelto per la ripartizione della morbilità e mortalità tifica nei diversi distretti della città (in mancanza di qualunque dato esatto sulla loro popolazione) dà effettivamente la fedele espressione dell'andamento della infezione nella città stessa.

Sulla scorta delle cifre relative così ottenute, ho potuto costruire i cartogrammi della morbilità e mortalità per tifo della città, come mostrano le tavole 2ª e 3ª.

Data la perfetta corrispondenza esistente fra i due rapporti con cui ho ottenuto le curve suddette, ho adottato come scala per la indicazione del maggiore o minore contributo in casi di morte per ogni distretto, il rapporto della mortalità ospitaliera per tifo proporzionale a 1000 morti della stessa malattia; fornendo questo rapporto delle cifre immensamente superiori a quelle date dal rapporto fra il numero dei morti di tifo e il numero dei morti in genere dell'ospedale ragguagliato a 1000, e quindi dando una scala molto più appariscente e in cui resta più facile, volendo, fare maggiori e più minute distinzioni. Del resto, le due scale si corrispondono perfettamente, e dove con l'una ad esempio si legge 1.37 morti per tifo su 1000 morti in genere di malattie comuni all'ospedale, con l'altra va letto 35 morti di tifo all'ospedale per 1000 tifosi morti ivi ricoverati.

Lo stesso dicasi per la scala (identica) del cartogramma della morbilità.

Se diamo uno sguardo a questi cartogrammi, vediamo che i distretti urbani più colpiti sono il 1°, il 3°, il 4° e il 9°; i meno colpiti sono il 7° e il 2°. A proposito del 7° distretto si tenga però presente, nella lettura del cartogramma, l'osservazione che sopra ho dovuto fare relativamente ai dati ospitalieri che lo concernono.

Ma su questi cartogrammi e sugli insegnamenti che essi ci forniscono, dovrò ritornare in seguito più minutamente.

***

Nulla di notevole offre l'infezione tifica in Firenze per quello che riguarda il sesso e l'età dei colpiti. Si verifica cioè qui quello che è stato generalmente osservato, e cioè che il sesso maggiormente colpito è il femminile e l'età è quella compresa fra 10 e 29 anni.

Distribuendo infatti i 630 morti per tifo nel decennio secondo il loro sesso, si ottiene un numero di morti maschi di 286, femmine 344.

Ripartendo poi i morti per gruppi di età, abbiamo il seguente risultato:

GRUPPI DI ETÀ	Morti in cifre assolute	Per cento
Fino a 1 anno	1	0.15
Da 1 anno a 4 anni	26	4.12
» 5 anni a 9 »	37	5.87
» 10 » 19 »	133	20.95
» 20 » 29 »	155	24.60
» 30 » 39 »	87	13.80
» 40 » 49 »	77	12.22
» 50 » 59 »	50	7.76
» 60 » 69 »	42	6.66
» 70 » 79 »	21	3.33
» 80 » 84 »	2	0.31

I due gruppi che dànno maggior numero di morti sono adunque, come in generale, quello da 10 a 19 e quello da 20 a 29 anni, che in complesso dànno 287 morti, cioè il 45.5 %.

***

Poche parole dirò intorno ai casi di tifo verificatisi durante il decennio nelle truppe di guarnigione nella nostra città.

Nello spazio dei 10 anni da me studiati trovo denunziati 122 casi di febbre tifoide nella guarnigione, sui quali ci sono stati 21 morto.

Da queste cifre sono naturalmente esclusi i casi, in cui la malattia fu dai militari contratta fuori di Firenze, ai campi di manovra o mentre si trovavano in licenza al proprio paese, e poi portata, in istato di incubazione o già dichiarata, in città.

Il quadro sèguente dà le cifre dei malati e dei morti ripartiti per ogni anno del periodo in questione.

QUADRO XII. — *Morbilità e mortalità per tifo nella guarnigione.*

ANNI	Casi di tifo	Morti	Per .100
1894	4	..	..
1895	8	2	25.0
1896	8	1	12.5
1897	22	2	9.1
1898	29	4	13.8
1899	26	3	11.5
1900	10	6	60.0
1901	5	1	20.0
1902	4	1	25.0
1903	6	1	16.6
Media del decennio	**12.2**	**2.1**	**17.2**

Anche questo movimento ospitaliero, per quanto esiguo, rispecchia fedelmente il movimento ospitaliero civile e il movimento cittadino del tifo, coi suoi tre distinti periodi di due minimi triennali e del periodo massimo quadriennale che li separa.

Il quoziente di mortalità specifica nella guarnigione è del 17.2 %, molto prossimo alla cifra che abbiamo ottenuto dagli ospedali civili (19.6) e che non si allontana nemmeno di molto dalla media generalmente osservata del 14-15 %.

Un fatto, però, degno di nota è la mortalità straordinaria registrata, sulla scorta delle cifre che ho potuto raccogliere, nell'anno 1900, mortalità che raggiungerebbe nientemeno che il 60 % dei colpiti; mentre negli ospedali civili sarebbe stata per lo stesso anno soltanto del 17.6 %.

Se, poi, facciamo il rapporto fra la mortalità generale della guarnigione e la mortalità specifica per tifo, otteniamo i seguenti valori proporzionali:

QUADRO XIII. — *Rapporto fra mortalità generale e mortalità per tifo nella guarnigione.*

ANNI	Mortalità generale	Morti di tifo	
		per anno	per 1000 morti in genere
1894	10	..	..
1895	18	2	111.1
1896	17	1	58.8
1897	16	2	125.0
1898	26	4	153.8
1899	24	3	125.0
1900	21	6	285.7
1901	17	1	58.8
1902	11	1	90.9
1903	16	1	62.5
Media del decennio	**17.6**	**2.1**	**119.3**

La forte proporzione dei morti di tifo rispetto ai morti in genere non ci deve fare alcuna meraviglia, pensando alla scarsa mortalità comune a tutto l'esercito, che accoglie nel suo seno la parte migliore e più sana della nostra gioventù. E che questa sia l'unica ragione che possiamo invocare a spiegazione degli altissimi valori relativi ottenuti, ce lo conferma questa semplice considerazione. Se prendiamo come media approssimativa della truppa di guarnigione in Firenze una forza annua di 3500 uomini, cifra certamente non esagerata (per il 1903, l'unico dato da me potuto avere, porta una forza di 4580 uomini), facendo il rapporto dei casi di morte per tifo nel decennio per 1000 uomini di truppa, otteniamo un quoziente annuo di 0.6 °/₀₀, valore che deve essere assai prossimo al vero (e nel caso peccare più per eccesso che per difetto), se si pensi che già per il decennio 1878-87 lo Sforza ha trovato per Firenze la cifra di 0.84 °/₀₀. Ora, una mortalità del 0.6 per 1000 uomini di truppa, pure essendo elevata (circa il doppio di quella fornita dalla popolazione *in toto*), non può giustificare le altissime percentuali sopra riportate, che rappresentano dal quintuplo al decuplo delle percentuali che abbiamo veduto fornite dalla popolazione civile (v. quadro X).

Ma per istituire dei confronti più minuti e particolareggiati per quello che concerne l'andamento del tifo nella guarnigione rispetto

a quanto avviene nella popolazione civile, mi occorrerebbe avere la forza media della guarnigione stessa per ogni anno del decennio studiato, dati che non mi è stato possibile ottenere, come già ho detto. Perciò non mi dilungherò maggiormente sull'argomento, limitandomi a rilevare la corrispondenza che si avverte così alla prima fra i due movimenti, civile e militare, dell'infezione tifica nelle sue linee generali.

***

Passando ora a studiare l'andamento del tifo durante l'anno, se facciamo le medie mensili del decennio della mortalità cittadina e della morbilità e mortalità ospitaliera, otteniamo i seguenti dati:

Quadro XIV. — *Medie mensili della morbilità e mortalità per tifo, in cifre assolute.*

	MESI											
	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Morbilità ospitaliera.	3. 8	3. 2	3. 4	5. 4	4 3	6. 2	11. 2	17. 1	22. 2	24. 1	20. 2	11 1
Mortalità ospitaliera.	1. 5	1. 1	1. 2	1. 6	0. 8	0. 7	2. 4	3. 3	3. 9	3. 6	3. 2	2. 9
Mortalità cittadina.	4. 1	3. 4	2. 8	3. 2	3. 3	3. 2	4. 9	8. 5	8. 4	6. 8	8. 2	6. 2

Dai quali dati costruendo un diagramma con le tre curve relative, si ha la seguente figura 10ª.

Da esso si vede come, partendo da un minimo che cade nei mesi di febbraio e marzo, l'infezione tifica vada lentamente aumentando fino al giugno; di qui l'ascesa si compie bruscamente, in modo da raggiungere il massimo della mortalità nell'agosto e settembre; poi ricomincia la discesa che in maniera più o meno regolare si compie fino a tornare al minimo. Questo per la curva della mortalità cittadina; le altre due, la curva cioè della morbilità e quella della mortalità ospitaliera, seguono con poche varianti l'andamento della precedente; soltanto va notato che il massimo della morbilità ospitaliera si verifica non nell'agosto e settembre, come avviene per la

mortalità, ma sibbene nell'ottobre, mese in cui le curve di mortalità, tanto cittadina quanto ospitaliera, già segnano un abbassamento

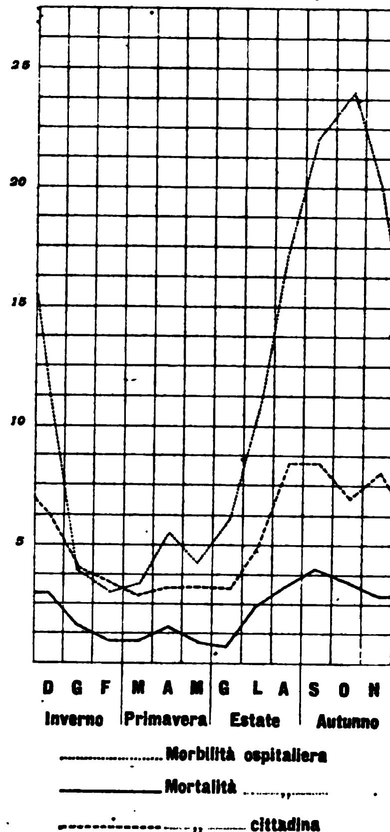


Fig. 10. — Movimento del tifo secondo i mesi e le stagioni (medie mensili assolute).

che non istà in relazione con il forte aumento della morbilità ospitaliera.

Lo stesso fatto, d'altra parte, si verifica nella morbilità cittadina (v. quadro II), in cui il massimo cade precisamente nello stesso mese di ottobre. Si dedurrebbe da ciò che le recrudescenze autunnali dell'infezione siano nel loro complesso maggiormente estese, ma meno intense; però tale deduzione sarebbe errata. Infatti, un semplice sguardo gettato sui prospetti della morbilità e mortalità cittadina e ospitaliera mensile d'ogni anno (riportati alla fine del lavoro) ci mostra come il tifo sia di regola già in declinazione nel mese di ottobre, anche per quello che riguarda il numero assoluto

dei casi di malattia, e che l'aumento della morbilità, così cittadina come ospitaliera, sia per eccezione portato unicamente da due anni, dal 1896 cioè e dal 1898; nei quali effettivamente dal settembre all'ottobre si è verificato un considerevole aumento dei casi di malattia, a cui non corrispose affatto un proporzionale aumento dei casi di morte; e ciò sia detto specialmente per il 1898, che già abbiamo veduto aver dato una infezione realmente molto più estesa del solito, ma meno grave.

Se dividiamo l'anno nelle 4 stagioni (come si vede appunto nella figura 10ª), si può osservare come l'infezione abbia carattere endemico nell'inverno e primavera per assumere un carattere epidemico nelle stagioni più calde, estate cioè ed autunno.

Facendo le medie stagionali, otteniamo un minimo assoluto nella primavera, un forte rialzo nell'estate che aumenta ancora in grado molto considerevole nell'autunno, per discendere nell'inverno a cifre assai basse, ma superiori ancora a quelle della primavera; così ci mostra il quadro seguente:

Quadro XV. — *Medie stagionali del tifo.*

	Stagioni			
	Inverno	Primavera	Estate	Autunno
Morbilità ospitaliera. . .	6.03	4.37	11.50	22.17
Mortalità id. . . .	1.83	1.20	2.13	3.5
Id. cittadina . . .	4 56	3.10	5.53	7.8

* * *

Si possono invocare dei fattori meteorologici, e, in caso affermativo, quali di essi, a spiegazione dell'andamento della infezione, come si mette in evidenza con le cifre suesposte?

Gli unici fattori meteorici, che possano avere una influenza sulla febbre tifoide, sono, notoriamente, la precipitazione acquea e la temperatura.

Vediamo adunque se la curva della mortalità cittadina per tifo possa essere messa in rapporto colle oscillazioni di questi due elementi.

Nel seguente quadro sono raccolte le medie mensili della temperatura e dell'acqua caduta per il decennio, ricavate dai registri dell'osservatorio del regio Museo di storia naturale:

Quadro XVI. — *Medie mensili della temperatura e dell'acqua caduta del decennio 1894–903.*

MESI	Temperatura — gradi	Acqua caduta — mm.	MESI	Temperatura — gradi	Acqua caduta — mm.
Gennaio	5.12	50.19	Agosto	23.51	46.30
Febbraio	6.22	60.06	Settembre	20.51	78.44
Marzo	9.49	75.99	Ottobre	15.17	103.49
Aprile	13.12	86.35	Novembre	9.83	82 38
Maggio	16.62	95.82	Dicembre	5.91	90.21
Giugno	21.12	63.86			
Luglio	24.2	58.47	Media annua	14.24	891.56

Se ora mettiamo le curve che risultano da questi valori in paragone con la curva del tifo, come mostra appunto la fig. 11ª, possiamo osservare anzitutto come la temperatura media descriva una curva regolarmente ascendente a partire dal gennaio, per toccare il massimo in luglio e agosto e scendere poi di nuovo con movimento regolare per tornare al minimo. La curva della precipitazione acquea, invece, presenta due minimi, nel gennaio l'uno, secondario, e nell'agosto il principale, e due massimi, il primo, secondario, nel maggio, il principale nell'ottobre; mostra poi un terzo rialzo abbastanza brusco nel dicembre.

La curva del tifo, espressa dalla mortalità cittadina in medie mensili, decorre invece nel primo semestre con lievi oscillazioni quasi orizzontale, sale abbastanza bruscamente a cominciare dal luglio fino all'agosto, si mantiene alla massima altezza appunto nell'agosto e settembre, e poi, subendo qualche oscillazione, ricomincia a discendere.

Se si tiene conto del periodo di incubazione del tifo e dello spazio di tempo che in media decorre dallo scoppio della malattia alla morte (ossia in tutto uno spazio di parecchie settimane, non

mai meno di 5-6), il rialzo della mortalità dal luglio all'agosto-settembre potrebbe sembrare in rapporto con la forte precipitazione acquea avvenuta un paio di mesi prima; ma questo rapporto viene

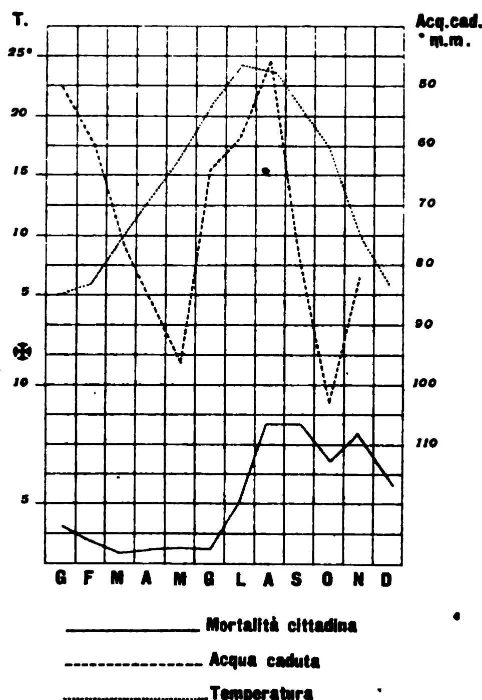


Fig. 11. — Movimento del tifo in relazione con la temperatura e l'acqua caduta.

subito dimostrato apparente dall'osservazione che il massimo assoluto di pioggia dell'ottobre non è affatto seguìto da un rincrudimento della mortalità, che appunto un paio di mesi dopo si avvicina rapidamente a toccare il suo minimo; d'altra parte, non vi è corrispondenza neppure fra la mortalità e i minimi di pioggia. Anche l'esame particolareggiato della mortalità mensile di ogni anno del decennio in rapporto con la quantità assoluta d'acqua caduta mensilmente (v. tavola 1ª) mette in chiaro la nessuna corrispondenza fra i due elementi, poichè quasi in ogni anno troviamo dei dati contraddittori.

Dobbiamo dunque concludere che, contrariamente a quanto è stato da altri osservato, per esempio in modo così evidente e caratteristico dal Di Mattei per Catania, non vi è alcun rapporto fisso

e costante, nè diretto, nè inverso, fra il movimento del tifo e la precipitazione acquea.

Al contrario, si mostra evidente l'esistenza di un rapporto fra il tifo e la temperatura, sebbene le due curve non presentino fra loro quella corrispondenza che, per esempio, ha dimostrato così perfetta il Bordoni-Uffreduzzi per Milano.

Se però siamo costretti, sulla scorta delle osservazioni fatte, ad escludere un rapporto costante e generale di causa ad effetto fra pioggia e tifo in Firenze, non è però detto che non vi possano essere delle piccole epidemie parziali, insorgenti repentinamente tre settimane circa dopo una pioggia copiosa, che sopravvenga dopo un periodo di caldo e asciuttore, per cui il terreno sia reso più facilmente attraversabile in breve tempo dall'acqua cadutavi, senza poterla trattenere e convenientemente filtrare; dando così ragione di ritenerle dovute all'effetto inquinante da essa pioggia esercitato sull'acqua di alimentazione per mezzo del trasporto di materiale infettante dal terreno nella falda acquea.

Che questo non solo sia possibile, ma debba succedere immancabilmente (e più oltre avrò occasione infatti di registrare alcune piccole epidemie locali di tal natura), lo farebbe ritenere e la costituzione fisica e l'inquinamento enorme del sottosuolo cittadino e la facilità di contaminazione, che ne deriva, della falda acquifera che fornisce la maggior proporzione dell'acqua potabile di conduttura (galleria filtrante dell'Anconella e Pozzo del Campo di Marte) e che alimenta i pozzi, di cui un discreto numero è ancora in uso nell'interno della città, e dei quali ben pochi relativamente, sono quelli veramente garantiti dalle infiltrazioni esterne, come dimostrano le frequenti analisi di acque che ci occorre di fare in laboratorio.

Per dimostrare questo fatto, ho paragonato i valori assoluti delle pioggie più forti e copiose verificatesi nei singoli anni del decennio col numero delle denunzie dei casi di tifo avutisi a cominciare da tre settimane circa dopo l'avvenuta pioggia per uno spazio di una ventina di giorni.

Orbene, per la grande maggioranza dei casi ho dovuto concludere fino dal principio in modo certamente negativo per quello che potesse essere un rapporto qualsiasi fra pioggia e aumento di casi di tifo.

Soltanto poche osservazioni, che, considerate superficialmente, potrebbero forse portarsi a sostegno di questa ipotesi, riferisco qui unicamente perchè, essendo una questione tanto discussa quella dell'origine idrica del tifo, possono avere un certo valore, anche quando la conclusione, che da esse si deve trarre, sia completamente negativa.

Ecco dunque le poche osservazioni che ho potuto raccogliere nel lungo periodo.

Nel 1897, anno che occupa un posto abbastanza basso nella quantità di acqua caduta, perchè inferiore alla media decennale (891. 56 mm.) di un centinaio di mm. precisi, si ebbe fra la primavera e l'estate un lungo periodo asciutto e assai caldo dal 26 maggio al 13 luglio, con soli mm. 16. 6 di pioggia caduta in diversi giorni a piccole quantità ogni volta, mentre la temperatura media da 16°. 5 nel mese di maggio saliva a 22°. 5 nel giugno per arrivare al massimo di 25°. 6 nel luglio, e di qui ricominciare a discendere a 23° nell'agosto, 19°. 6 nel mese di settembre, 13°. 8 nell'ottobre.

Nei giorni 13-16 luglio sopravvengono delle pioggie piuttosto abbondanti, in tutto 72. 8 mm. d'acqua caduta, di cui 25. 7 mm. nel giorno 13 e 40. 5 nel giorno 15, durante due temporali. Dopo tre settimane, si verifica un subito rialzo nelle denunzie dei casi di tifo, che da 36, quali erano nel mese di luglio, salgono a 60 nell'agosto, e di cui 43 sono denunziati nello spazio di tempo dal 3 al 24.

Nel mese di agosto, dopo un periodo piuttosto asciutto di 30 giorni con 21. 2 mm. di pioggia caduta in 6 giorni diversi, si misurano nei giorni 16, 20 e 23 mm. 91. 0 d'acqua caduta, e cioè 38. 1 mm. il giorno 16, 33. 4 mm. il 20, ambedue le volte in seguito a temporale, e 19. 5 mm. il 23. Tre settimane dopo, nuovo rialzo nel numero dei casi, che negli ultimi giorni già erano andati diminuendo; tanto che dal 6 al 26 settembre si hanno 38 casi registrati, ossia più della metà di tutto il mese che ne conta 63.

Finalmente, nello stesso mese di settembre, dopo un periodo asciutto di 17 giorni (con soli 0. 1 mm. di pioggia), si ha nei giorni 10-11 una pioggia temporalesca di 62. 9 mm. (59. 3 mm. nel 10 e 3. 6 nell'11); e dopo tre settimane, dal 1° al 20 ottobre, si contano 31 denunzie di casi di tifo su 42 in tutto il mese.

Cosicchè nei tre periodi di tempo suddetti di 60 giorni in totale si sono avute 112 denunzie di tifo, press'a poco cioè il terzo delle denunzie totali dell'anno, che furono 344.

Già da questi dati di fatto, si può vedere quanto sia debole e mancante la dimostrazione di un nesso certo fra le tre pioggie dell'estate del 1897 e il movimento epidemico del tifo verificatosi dal luglio al novembre; e tanto meno tale dimostrazione regge alla critica, se ci facciamo ad esaminare i dati fornitici dalla mortalità. Questa, infatti, ha cominciato la sua brusca curva ascendente fino dal luglio, e precisamente con 13 morti ripartiti molto regolarmente dal 3 al 31, in numero cioè perfettamente eguale a quello avutosi nell'agosto, mentre furono 16 nel settembre, 11 e 12 rispettivamente nel mese di ottobre e novembre.

Il movimento ascendente della curva del tifo sarebbe dunque incominciato, e in modo veramente brusco e repentino, fino dai primi del luglio, prima cioè delle pioggie estivo-autunnali, e anzi nel bel mezzo di un periodo asciutto, avendo avuto il mese di giugno soli 13. 3 mm. di pioggia; quindi sarebbe da mettere piuttosto in relazione con l'aumento della curva termica, senza, al più, escludere che alle cause dell'aumento dell'infezione solito a verificarsi nell'estate, si sia aggiunta in quest'anno l'azione delle pioggie, della quale ignoriamo l'entità, ma cui, se esiste, dobbiamo ritenere localizzata a singoli e piccoli focolai.

Ciò dimostrerebbero le seguenti cifre:

QUADRO XVII.

	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Temperatura media C°	22 5	25.6	23 1	19 6	13.8	8.6	6.0
Acqua caduta . mm.	13.3	87.3	95.7	93 0	102.0	45.4	60.1
Casi di tifo . . . n.	14	36	60	63	42	40	24
Morti . . . . . »	3	13	13	16	11	12	4

Nel 1900, dopo il solito periodo caldissimo e asciutto estivo, si ebbe un ottobre burrascoso e nel tratto compreso fra il 13 e il 23 caddero mm. 54.3 di pioggia. Passate tre settimane, il numero dei casi di tifo potuti raccogliere sale in modo insolito, tanto che dall'8 al 28 di novembre i casi denunziati ammontano a 92 su 108 che furono in tutto il mese. L'aumento della mortalità concorda con quello dei casi di malattia, poichè da 4 morti avutisi nell'ottobre si sale a 13 nel mese di novembre e a 15 nel dicembre: la mortalità resta ancora notevolmente alta nel gennaio 1901, per poi bruscamente discendere nel mese successivo; come appare meglio dal quadro seguente:

QUADRO XVIII.

	Mesi dell'anno 1900			Mesi dell'anno 1901		
	Ottobre	Novembre	Dicembre	Gennaio	Febbraio	Marzo
Temperatura media . . . C°	17.1	11.5	6 1	2.9	2.8	8.8
Acqua caduta . . . . mm.	59.3	168.4	15.9	12.0	67.1	167.2
Casi di tifo . . . . . . n.	41	108	43	16	11	7
Morti . . . . »	4	13	15	11	4	2

Ma già, anche in quest'anno, si era avuto il solito movimento ascensionale del principio dell'estate (e in grado tutt'altro che indifferente), senza che si fosse avuta da tempo una pioggia copiosa, con cui metterlo in rapporto.

Riferirò un'altra osservazione, relativa questa al 1898, l'anno maggiormente piovoso di tutto il decennio, con 1144.7 mm. di acqua caduta.

Orbene, in quell'anno, dopo un periodo caldo e asciutto di 21 giorni (con soli 4.7 mm. di pioggia, e con un totale di 63 mm. dal 30 di maggio, ossia per 36 giorni), si ebbe nei giorni 5 e 6 luglio una pioggia torrenziale di 53.1 mm.; dopo tre settimane, il numero delle denunzie dei casi di tifo, mantenutosi a 18 dal 1° fino al 26 luglio, cresce fino a raggiungere il nu-

mero di 47 dal 26 luglio a tutto agosto; la mortalità, da 3 nell'ultima pentade del luglio, sale a 10 nell'agosto, verificandosi per più dei due terzi nella seconda metà del mese (3 morti fino al 15, 7 dal 16 al 31). L'aumento dell'infezione si fa anche maggiore nei mesi successivi per andare poi lentamente decrescendo dall'ottobre; e questo aumento potrebbe mettersi in relazione con nuove pioggie del settembre, nel qual mese, dopo un periodo asciutto e caldo piuttosto lungo (dal 9 agosto al 6 settembre 28.5 mm. di pioggia, con temperature assai alte), caddero dal 26 al 30 mm. 44.9 di pioggia, con due temporali, di cui uno diede da solo 23.8 mm. Dopo tre settimane, dal 17 al 31 ottobre, ossia in 15 giorni, si ebbero 56 casi su 104 che se ne poterono registrare in tutto il mese e altri 16 se ne contarono dal 1° al 5 novembre; cioè nel periodo di 20 giorni i casi raccolti ammontano in tutto a 72.

Paragonando anche qui in un quadro i singoli elementi, abbiamo il seguente prospetto:

QUADRO XIX.

	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Temperatura media C°	21.3	22.6	24.2	21.6	16.3	12.8	6.4
Acqua caduta . mm.	62.4	151.1	49.5	54.9	73.4	137.8	49.5
Casi di tifo . . . n.	10	22	43	64	104	54	30
Morti . . . . . »	3	3	10	12	11	10	8

Anche per questa recrudescenza estivo-autunnale valgono le considerazioni fatte per le precedenti: dato il movimento uniformemente crescente dell'infezione tifica, quale lo abbiamo studiato, in questo periodo dell'anno, il numero dei casi di malattia registrati e dei casi di morte verificatisi è troppo esiguo per poter riconoscere come causa una contaminazione delle acque sotterranee in conseguenza delle pioggie in tal periodo avvenute: non si esclude però, nè ragionevolmente si potrebbe, che queste ultime possano avere avuto una parte, per quanto piccola, come concausa, nella maggior diffusione del tifo nel periodo estivo-autunnale del 1898, cagionando la contaminazione dell'acqua di singoli pozzi, per cui abbiano avuto origine (come realmente vedremo che successe in quell'anno) delle epidemie localizzate in qualche famiglia o gruppo di famiglie.

Ma, la conclusione unica che possiamo trarre dal nostro studio si è che non si può invocare la pioggia come causa generale delle recrudescenze estivo-autunnali del tifo in Firenze.

***

Mi è piaciuto riportare l'ultima osservazione relativa al 1898, perchè a proposito della pioggia torrenziale del 5-6 luglio il compianto dott. D. Torsellini, allora medico provinciale di Firenze, aveva potuto constatare che, mentre l'acqua della galleria filtrante dell'Anconella (che costituisce una gran parte dell'alimentazione idrica della città) conteneva fino allora un numero limitato di germi, pochi giorni dopo quella pioggia il contenuto batterico suo si trovò più che quadruplicato, per poi diminuire in breve spazio, tornando al normale, dopo nuovi aumenti dovuti a successive pioggie, dal mese di ottobre in poi (V. *Relazione sulle condizioni sanitarie della provincia di Firenze per l'anno 1898,* a pag. 13). E in base appunto a questa osservazione, egli accenna alla grande importanza dell'azione delle pioggie sulle acque dei pozzi rispetto al regime del tifo.

E qui farò notare come sarebbe stato opportuno il poter avere dei dati sul tenore batteriologico delle acque di conduttura di Firenze, ricavati da analisi regolari e metodiche fatte a brevi intervalli di tempo l'una dall'altra, come si pratica in altre città. Sarebbe questo stato un ottimo argomento da portare nella discussione sul qualunque rapporto avesse potuto esistere fra una pioggia e una recrudescenza anche piccola dell'infezione tifica, da riferirsi all'acqua di alimentazione della città. Disgraziatamente, questo dato mi è mancato in modo assoluto, perchè, mi fu detto, non si hanno al nostro ufficio municipale di igiene delle analisi periodiche delle acque condottate.

Che, però, l'acqua di conduttura sia esposta ad eventuali inquinamenti, siamo autorizzati a ritenere per provato da molte osservazioni fatte negli anni passati, e prima e dopo la tristamente famosa epidemia dovuta all'acqua di Montereggi.

Ho poco innanzi citato l'osservazione fatta dal dott. Torsellini sull'acqua della galleria filtrante dell'Anconella; prima di lui lo stesso fatto, di un enorme aumento cioè nel numero dei germi in essa contenuti, in seguito a certe pioggie, era stato notato dal dottore Palamidessi, come si può vedere consultando il suo lavoro *L'acqua potabile di Firenze* (Giornale della R. Società Italiana di Igiene, a. XVII, 1895, n.° 3).

Da analisi batteriologiche ripetutamente eseguite per oltre un anno di seguito, sono risultate fortissime oscillazioni nel contenuto batterico di tale

acqua: da un minimo di 210 si raggiungevano dei massimi di 1937 e fino 4430 germi per 1 cmc. Quest'ultima cifra enorme (più del decuplo della cifra media della massima parte delle osservazioni) si riscontrò il 15 settembre 1893 in seguito a pioggia dirotta caduta dopo molti giorni di siccità. Il numero di 1937 germi per cmc. si raggiunse il 1° ottobre del 1894, dopo delle pioggie durate parecchi giorni. Altri aumenti più o meno considerevoli nel numero dei germi in rapporto a pioggie si trovano citati nel lavoro.

Non nego però che questi dati ci siano forniti da campioni di acqua prelevati o alla cannella di laboratorio o a fontanelli pubblici situati in vari punti della città; nella osservazione del Torsellini poi, non è menzionato da qual punto della conduttura provenisse il campione analizzato, se dalla galleria direttamente, o da un serbatoio, o da una cannella di erogazione in città. Certo, maggior valore avrebbero questi dati, se fossero forniti da esami fatti sull'acqua direttamente attinta alla galleria; chè in tal caso proverebbero in modo inoppugnabile la insufficiente filtrazione dell'acqua in certi periodi di pioggie. Ma la stessa variabilità nel contenuto batterico dell'acqua dell'Anconella sarebbe stata riscontrata pure dal prof. Banti in esami eseguiti su campioni direttamente prelevati dalla galleria: in tali condizioni di fatto, l'acqua della galleria filtrante dell'Anconella si deve dunque ritenere non sufficientemente protetta (V. conclusioni del rapporto della Commissione, nominata nel 1886 dalla Giunta comunale in persona dei professori Stefanelli, Banti e Roster, citate nella pubblicazione del prof. Roster: *Acqua potabile a Firenze*, 1895). Difetto questo, del resto, abbastanza comune a tal genere di impianti: per non citarne che due, di cui ho conoscenza *de visu*, ricorderò le gallerie della valle del Sangone presso Sangano per l'approvvigionamento di Torino e quella della valle dell'Ellero, ai tetti Dho sopra Roccaforte, che provvede di acqua la città di Mondovì.

Le prime sono state oggetto di importanti studi per parte dell'Abba, Rondelli e Orlandi, e hanno al loro passivo un'epidemia tifica cagionata a Torino nel 1896; l'acqua della galleria filtrante di Val d'Ellero, per quanto insufficientemente protetta, non ha mai portato il tifo a Mondovì. Ma ciò non toglie che essa pure sia, come l'acqua di Torino, come la nostra di Firenze, sospetta e quindi pericolosa.

Ciò posto, è da lamentare che non mi sia stato possibile avere, come sopra ho detto, i risultati di analisi periodiche su quest'ultima istituite.

L'unico dato che io abbia potuto avere a mia disposizione è quello relativo al genere di approvvigionamento in acqua delle case colpite dal tifo, ogni caso denunziato all'ufficio d'igiene por-

tando un'annotazione appostavi d'ufficio, quando la casa, in cui si è verificato, sia dotata di acqua di condottura municipale.

In base a tale indicazione io ho perciò riunito in una tabella, mese per mese, anno per anno, in una colonna tutti i casi denunziati provenienti da abitazioni fornite di acqua di condotta, mettendoli di contro agli altri casi provenienti da abitazioni non portanti nessuna indicazione speciale sul genere del loro approvvigionamento in acqua, e che io ho tutte comprese fra quelle alimentate con acqua di pozzo; sebbene molte siano le famiglie che, essendo prive dell'acqua municipale nelle loro case, pur tuttavia non ne consumano altra, andando ad approvvigionarsi nella via al più prossimo fontanello pubblico, dei quali ne esiste a tal uopo un certo numero sparsi per la città (al 31 dicembre del 1902 erano in numero di 217). Di un tale errore va tenuto il debito conto nell'apprezzare i risultati del confronto istituito con lo spoglio in parola.

Questo spoglio però io l'ho eseguito soltanto per i casi denunziati verificatisi nel perimetro della città (cinta daziaria); e ciò, naturalmente, per poter avere due quantità paragonabili fra di loro; poichè è evidente che, se vi comprendevo anche tutti i casi provenienti dal territorio comunale esterno (campagna), avvenuti in abitazioni unicamente provviste di acqua di pozzo o di qualche fonte locale, non potevo più paragonare le cifre ottenute dal territorio comunale intiero: città, suburbio e campagna, con quelle ricavate da una parte sola di esso: città e frazioni di suburbio. Poichè è ben vero che anche una parte del suburbio è alimentata dall'acqua di condotta; ma non potendo avere una delimitazione precisa del territorio, della cui morbilità avrei dovuto tener conto, se vi comprendevo anche il suburbio, ho escluso senz'altro esso pure; limitandomi perciò, ripeto, al solo territorio compreso nella cinta daziaria, che è quello dei 10 distretti medici urbani; come si vede nei cartogrammi annessi al presente lavoro.

Uno spoglio analogo per i casi di morte non l'ho potuto fare, come pure avrei voluto, per la mancanza delle relative indicazioni appostevi d'ufficio.

Ho potuto in tal modo classificare 1620 casi di tifo stati denunziati, ottenendo i seguenti valori annuali:

QUADRO XX. — *Ripartizione dei casi di tifo secondo il genere di approvvigionamento in acqua.*

ANNI	Acqua di condotta	Acqua di pozzo	ANNI	Acqua di condotta	Acqua di pozzo
1894.	46	103	1900.	127	112
1895.	22	75	1901.	57	90
1896.	25	68	1902.	77	101
1897.	93	97	1903.	81	77
1898.	110	94			
1899.	81	84	Decennio . . .	**719**	**901**

Dalle cifre totali del decennio apparirebbe un'abbastanza notevole diversità di comportamento fra i due generi di approvvigionamento in acqua, per quel che riguarda la distribuzione dei casi di tifo: diversità che starebbe in favore dell'acqua di conduttura rispetto all'alimentazione con acqua di pozzo; avendosi la proporzione di 443.8 su 1000 casi per la prima contro 556.1 per quest'ultima, ossia 112.3 casi su 1000 in meno fra quelli verificatisi in abitazioni allacciate alla conduttura municipale. Ora, questa differenza potrebbe fare una certa impressione. Ma, se consideriamo partitamente le cifre dei singoli anni, le vediamo in cinque di essi essere press'a poco eguali per i due generi di approvvigionamento, con differenze affatto trascurabili, in un anno la differenza a carico dell'acqua di pozzo non essere molto grande, e soltanto in quattro esservi un forte distacco tra i valori delle due colonne. Quindi, deduzioni ricavate da medie ottenute con queste cifre, non possono avere un gran valore probatorio in un senso piuttosto che in un altro; e tutto quello che si possa dire in base ad esse, si è che il comportamento dei due generi di provvista di acqua rispetto al tifo è press'a poco identico, come del resto press'a poco identica è la natura delle due acque.

Quanto all'errore che mi può esser prodotto dall'avere io dovuto inscrivere nella colonna dell'acqua di pozzo dei casi appartenenti invece a quella dell'acqua potabile per l'avvenuto approvvigionamento a un pubblico fontanello, in mancanza di concessione di acqua condotta municipale a domicilio (come ho detto più sopra), non credo di allontanarmi di molto dal vero, se lo stimo assai piccolo, incapace cioè di spostarmi i risultati ottenuti; e ciò in base alla considerazione che il numero dei pubblici fontanelli (anche ammettendoli, per ipotesi, tutti compresi nel perimetro della cinta daziaria, il che è ben lungi dall'esser vero) è esiguo rispetto alla superficie della città e alla popolazione; e d'altra parte tenendo presente ciò che il quadro XXVIII ci dimostrerà in seguito, che cioè il confronto fra la città (alimentazione con acqua di conduttura a preferenza) e il suburbio e campagna (in grandissima prevalenza acqua di pozzo), riguardo al genere di alimentazione idrica in rapporto col tifo, svela la stessa uniformità di comportamento fra la prima e questi ultimi, dimostrando così esso pure che l'acqua di conduttura si trova press'a poco nelle identiche condizioni che quella dei pozzi in generale, per quanto concerne la diffusione del tifo. E si noti ancora che, per quanto cattivi e mal tenuti, i pozzi del circondario esterno si possono ritenere, senza tema di errare, scavati in un sottosuolo migliore di quello cittadino.

Se poi ci facciamo ad esaminare più partitamente le cifre ottenute, potremo osservare che nella maggior parte degli anni il numero delle denunzie di casi avvenuti in abitazioni provviste di

acqua di pozzo supera, e in certi anni di assai, il numero delle denunzie di casi avutisi in abitazioni collegate alla rete condotta; in alcuni anni al contrario il numero delle seconde supera più o meno il numero delle prime. Ora, siccome questo avviene precisamente negli anni 1897, 1898 e 1900, più sopra studiati per quanto concerne la presunta origine idrica (da azione meteorica) di certe piccole epidemie estivo-autunnali; e in minor misura si verifica pure nel 1903, per il quale qualche cosa di simile si potrebbe dire rispetto all'aumento dei casi denunziati e delle morti avvenute nei mesi di agosto-ottobre, si potrebbe credere che questa, più che una pura e semplice coincidenza, fosse l'espressione della parte che alla maggior diffusione del tifo in quegli anni avesse preso l'acqua di condottura in proporzione più forte che non l'acqua di pozzo.

Vediamo se questa supposizione sia fondata e l'origine idrica di queste recrudescenze tifiche si possa sostenere (indipendentemente dall'azione delle acque meteoriche già scartata), addebitando di esse l'acqua di condottura.

Paragonando i casi di tifo stati denunziati mensilmente nelle epoche accennate, a seconda del genere di approvvigionamento di acqua delle case in cui essi si verificarono, si ha il seguente prospetto:

QUADRO XXI.

ANNI	Luglio		Agosto		Settembre		Ottobre		Novembre		Dicembre	
	Acqua di condotta	Acqua di pozzo	Acqua di condotta	Acqua di pozzo	Acqua di condotta	Acqua di pozzo	Acqua di condotta	Acqua di pozzo	Acqua di condotta	Acqua di pozzo	Acqua di condotta	Acqua di pozzo
1897. . . .	8	11	15	16	16	23	17	10	17	12	3	5
1898. . . .	11	2	15	11	19	19	34	22	18	17	4	12
1900. . . .	..	..	..	..	..	..	12	18	36	23	16	13

dal quale viene messo in evidenza il solito aumento estivo-autunnale dei casi di tifo, indifferentemente però per le abitazioni provviste o no di acqua di condotta, senza che ci sia un subito e forte rialzo da potersi mettere in relazione con una causa così generale di diffusione, quale sarebbe l'acqua della condottura.

Se poi prendiamo di nuovo in esame le singole piccole epidemie già descritte e, invece che per la totalità dei casi denunziati e potuti appurare, le consideriamo soltanto relativamente ai casi avvenuti nel perimetro della città e potuti classificare secondo l'approvvigionamento in acqua delle abitazioni in cui i casi stessi sono avvenuti, potremo verificare se l'aumento dei casi nella sola città persista e in quali proporzioni, se la proporzione fra casi avvenuti in abitazioni allacciate alla conduttura e casi avutisi in abitazioni non allacciate si mantenga.

I prospetti che seguono ci danno le cifre relative:

QUADRO XXII. — *Epidemia estivo-autunnale 1897.*

	MESI					
	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre
Casi denunziati (in totale)	14	36	60	63	42	40
Morti (in totale)	3	13	13	16	11	12
Casi denunziati (città *)	5	19	31	39	27	29
Morti (città)	1	9	8	10	7	10

* Qui sono riportati soltanto i casi potuti classificare secondo il genere dell'approvvigionamento in acqua delle abitazioni, in cui i medesimi sono accaduti.

QUADRO XXIII. — *Epidemia estivo-autunnale 1898.*

	MESI					
	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre
Casi denunziati (in totale)	10	22	43	64	104	54
Morti (in totale)	3	3	10	12	11	10
Casi denunziati (città)	2	13	26	38	56	35
Morti (città)	3	3	8	8	8	5

QUADRO XXIV. — *Epidemia autunnale 1900.*

	Mesi dell'anno 1900			Mesi dell'anno 1901		
	Ottobre	Novembre	Dicembre	Gennaio	Febbraio	Marzo
Casi denunziati (in totale)	41	108	43	16	11	7
Morti (in totale)	4	13	15	11	4	2
Casi denunziati (in città)	30	59	29	7	2	2
Morti (in città)	4	11	12	7	3	..

E classificando le cifre dei casi denunziati a seconda dell'approvvigionamento di acqua, abbiamo la seguente ripartizione:

QUADRO XXV. — *Epidemie estivo-autunnali 1897 e 1898.*

	Giugno		Luglio		Agosto		Settembre		Ottobre		Novembre	
	Approvvigionamento in acqua di											
	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo
1897												
Casi denunziati (in totale) .	2	7	16	15	25	22	23	41	21	14	20	15
Id. (in città). .	1	4	8	11	15	16	22	17	17	10	17	12
1898												
Casi denunziati (in totale) .	2	3	14	4	17	15	21	29	36	56	23	29
Id. (in città). .	1	1	11	2	15	11	19	19	34	22	18	17

QUADRO XXVI. — *Epidemia autunnale 1900.*

	Mesi dell'anno 1900						Mesi dell'anno 1901					
	Ottobre		Novembre		Dicembre		Gennaio		Febbraio		Marzo	
	Approvvigionamento in acqua di											
	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo
Casi denunziati (in totale) .	12	23	52	49	19	15	9	9	3	3	2	3
Id. (in città). .	12	18	36	23	16	13	4	3	2	..	1	1

Si vede dunque da questi quadri che realmente l'aumento dei casi denunziati persiste anche nella sola città, indipendentemente dal contributo che vi possono portare i casi verificatisi nel suburbio e nella campagna; che permane pure la maggiore proporzione dei casi avvenuti in abitazioni provviste di acqua condotta che non in quelle alimentate da acqua di pozzo.

A giudicare da questi dati, si parrebbe autorizzati a ritenere che queste diverse recrudescenze epidemiche siano, se non in tutto, almeno in parte, di origine idrica e che alla loro diffusione abbia per la sua parte contribuito anche l'acqua di conduttura.

Ma non si può non notare subito che l'andamento di queste recrudescenze non è quale ci si dovrebbe a rigore attendere, se esse riconoscessero per causa un inquinamento dell'acqua della conduttura cittadina. Infatti, come già ho osservato, l'aumento dei casi incomincia fin dal principio dell'estate, col giugno cioè, e va gradatamente salendo nei mesi successivi in tutti gli anni indistintamente; non si ha un vero scoppio brusco, subitaneo di casi, quale si suole verificare nelle epidemie, anche limitate, di origine idrica in dipendenza dall'inquinamento di un'acqua condotta, la quale necessariamente deve diffondere l'infezione contemporaneamente per tutta la zona che essa alimenta.

Riguardo a quest'ultima condizione, indispensabile per poter ammettere l'origine idrica di qualunque epidemia cagionata dalla contaminazione in massa di un'acqua di conduttura, vediamo che essa nel nostro caso manca completamente, se distribuiamo per distretti i casi avvenuti in abitazioni allacciate alla conduttura

municipale, stati denunziati nelle tre epoche prese in esame, come dimostra questo quadro:

QUADRO XXVII.

	Distretti medici urbani									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1897: luglio–novembre .	13	8	16	12	4	3	5	7	4	..
1898: luglio–novembre .	16	15	17	23	9	10	3	1	1	2
1900-01: ottobre-gennaio	14	8	12	9	6	6	1	2	6	4

Esaminando queste cifre, vediamo subito:

1° l'esiguità delle cifre rispetto ad una causa di diffusione così generale della malattia, quale è data dalla contaminazione di un'acqua di conduttura, esiguità troppo evidente anche se si vuol tener conto dell'aggiunta, che col calcolo in base alla mortalità media specifica per tifo si potrebbe fare al numero dei casi denunziati;

2° la ripartizione dei casi in modo ineguale e contraddittorio, nel senso che distretti alimentati da acqua della stessa provenienza e conduttura, come ad esempio il 3° e 4° da una parte e il 7° e 9° dall'altra (acqua della Galleria filtrante dell'Anconella) presentano differenze enormi; lo stesso dicasi del distretto 1° e del 10°, alimentati da due acque, e cioè da quella dell'Anconella e in parte dall'acqua di sorgente detta di Montereggi;

3° che tale ripartizione è in perfetta corrispondenza con la distribuzione del tifo in città, come mostrano i cartogrammi relativi.

Dal complesso di questi fatti dunque dobbiamo ritenere che i casi di tifo avvenuti in abitazioni provviste di acqua condotta, se pur superiori e talora non poco, a quelli verificatisi in abitazioni sprovviste di tale acqua, non possono farci attribuire la malattia piuttosto a questo mezzo che non a tutte quelle altre cause, che nel loro complesso danno la fisionomia dell'infezione tifica nella stagione estivo-autunnale.

Che, finalmente, l'acqua di conduttura, che alimenta Firenze, non abbia avuto nel decennio studiato alcuna parte nella propagazione del tifo, stanno a dimostrarlo le cifre che si ottengono quando paragoniamo fra di loro i casi di tifo verificatisi per una parte nel

perimetro della città, e per l'altra in tutte le frazioni del suburbio e campagna sommati insieme.

È evidente che se l'acqua potabile fosse compromessa nella diffusione del tifo, una maggiore proporzione di casi si dovrebbe avere nel perimetro della città, come quella in cui l'acqua stessa è maggiormente consumata, che non nel suburbio e nella campagna, dove l'acqua di condotta è pochissimo distribuita nel primo e manca assolutamente nella seconda.

E questo confronto è esposto nel seguente quadro, in cui riporto i casi di tifo denunziati nel decennio, ripartiti per città e circondario esterno, in cifre assolute e relative alla popolazione media del decennio:

Quadro XXVIII.

ANNI	Popolazione presente per l'interno della città	Popolazione presente per il circondario esterno	Casi di tifo denunziati in città	Casi di tifo denunziati nel circondario esterno	Casi denunziati per 10,000 abitanti in città	Casi denunziati per 10,000 abitanti nel circondario esterno
1894	134,917	53,990	172	52	12.74	9.63
1895	136,267	54,530	119	56	8.73	10.26
1896	137,471	55,011	117	46	8.51	8.36
1897	139,010	55,621	243	98	17.48	17.61
1898	140,601	56,264	257	107	18.27	19.01
1899	142,183	56,897	206	74	14.48	13.00
1900	144,215	57,710	276	132	19.13	22.87
1901	146,712	58,710	184	85	12.54	14.47
1902	149,088	59,660	198	101	13.28	16.92
1903	151,882	60,779	187	74	12.31	12.17
Media del decennio	**142,234**	**56,917**	**195.9** *	**82.5**	**13.7**	**14.4**

* Sul totale di 2801 casi potuti raccogliere, ne mancano qui alcuni, perchè non potuti assegnare a distretto.

La popolazione per i singoli anni del decennio è stata calcolata, per l'interno della città e per il circondario esterno, sulle cifre rilevate in occasione del censimento del 10 febbraio 1901. Il rilevamento eseguito nel 1901 è l'unico che si abbia al nostro Ufficio di anagrafe riguardo alla distribuzione della popolazione per frazioni, centrale e periferiche.

Queste cifre adunque mostrano che il circondario esterno, alimentato preferibilmente con acqua di pozzo, ha fornito in tutto il

decorso dei dieci anni ultimi, proporzionalmente alla popolazione, un numero di casi di tifo press'a poco eguale alla città; e ciò, mentre è in contraddizione con quanto generalmente si ammette circa la maggior diffusione del tifo nei grandi centri abitati in conseguenza dell'addensamento della popolazione, troverebbe la sua spiegazione nelle migliori condizioni locali della città rispetto al circondario esterno, dovute principalmente appunto alla provvista di acqua di condotta, alla fognatura, alle disinfezioni.

Ma vi ha di più; e se osserviamo partitamente le cifre annuali forniteci dal quadro suddetto, possiamo trovare che per l'appunto nei tre anni 1897, 1898 e 1900, in cui si sarebbe potuto, sebbene con molto artificio, tirare in causa anche l'approvvigionamento di acqua, le denunzie di casi di tifo pervenute dal circondario esterno hanno sempre superato (specialmente nel 1900) quelle provenienti dall'interno della città, contrariamente a quanto si sarebbe dovuto verificare se in quest'ultima fosse stata compromessa, anche in minima misura, l'acqua di condotta.

Sulla scorta di tutti questi fatti e delle considerazioni che se ne deducono, dobbiamo dunque concludere che l'acqua di conduttura non ha avuto alcuna parte nella diffusione del tifo in Firenze, in tutto il periodo studiato.

Ma, per quanto non sia neppure stato possibile stabilire un rapporto certo ed evidente fra le pioggie e nessuna delle recrudescenze estivo-autunnali della malattia, solite a verificarsi ogni anno immancabilmente, tuttavia non si può negare, per quello che concerne il tifo sporadico in ispecie, che l'acqua adibita per gli usi domestici contribuisca per la sua parte alla diffusione della malattia. Specialmente questo deve succedere per molti pozzi, la cui acqua, una volta inquinata (e ciò non può non essere molto facile, data la nessuna o poca cura con cui sono tenuti ed usati, l'enorme inquinamento del terreno in cui sono scavati, le comunicazioni immancabili, come esami chimici e batteriologici tutti i giorni ci dimostrano, fra essi e i pozzi neri, ecc., ecc.), verrebbe a dare origine a casi di infezione localizzati a qualche abitazione, a poche famiglie.

Altrettanto si può dire al riguardo di un guasto eventuale in un tratto di conduttura dell'acqua potabile o di una fontanella, o dell'eventuale stabilirsi di una pressione negativa in qualche tratto di condotta (fatto che succede spessissimo ad esempio nel nostro laboratorio per la scarsezza dell'acqua) o altro inconveniente qualsiasi, per cui sia resa possibile una penetrazione, per infiltramento o per aspirazione, di materiale inquinante nell'acqua, la quale lo diffon-

derebbe così in una zona più o meno limitata, ma sempre ristretta, per quello che ne sappiamo.

Per ultimo riporterò qui, relativamente alla contaminazione delle acque di pozzo, alcune osservazioni state accertate nel decennio.

Diverse piccole epidemie famigliari, avvenute qua o là in anni diversi, debbono senza alcun dubbio, dalle indagini state fatte per parte dell'uffizio di igiene, ascriversi all'uso di acqua di pozzo contaminata; ad esempio, quelle del settembre 1897 nell'Istituto Demidoff (sei casi) e in una casa colonica di via dei Roccettini, presso Badia (con quattro casi); dell'ottobre 1898 di via Senese, ai numeri civici attigui 87 e 89 (otto e sei casi rispettivamente); del settembre 1899, pure in via Senese al n. 101 (sette casi); del luglio 1900 nel Convento della Fantina (con dodici casi).

Oltre a questi focolai epidemici, abbiamo però anche lo studio delle cifre sopra esposte, che conforta la nostra tesi, doversi non pochi casi sporadici di tifo con tutta certezza all'acqua contaminata del sottosuolo cittadino.

Ma è questa sola la causa del tifo in Firenze? Solamente questa dobbiamo invocare quale argomento per definire la fisionomia, l'andamento, il regime dell'infezione tifica nella nostra città?

***

Ed eccoci naturalmente portati, dalla discussione dei dati raccolti e delle cifre da essi ricavate, di fronte alle due teorie che oggi si contendono il campo riguardo alla origine e alla diffusione della infezione tifica: la teoria idrica e la teoria contagionistica.

Da quanto abbiamo finora veduto, dobbiamo senz'altro escludere la prima di esse nello spiegare l'andamento del tifo in Firenze, non potendosi ammettere l'origine idrica come una causa generale dell'insorgere e del propagarsi della infezione, ma dovendo, sulla scorta dei fatti, limitare l'azione dell'acqua inquinata dei pozzi a singole epidemie localizzate in certi punti molto limitati (famiglie o gruppi di poche famiglie) e, in maggior misura, a singoli casi sporadici di tifo.

Resta la seconda teoria, la contagionistica, con la quale esclusivamente si sono potute spiegare delle epidemie anche molto estese, nelle quali l'acqua di alimentazione non aveva in modo indubbio nessuna parte: ad esempio, l'epidemia del circondario di Beuthen O/S. in Germania, recentemente descritta dal Noetel.

Ma, più che per spiegare una epidemia, questa teoria vale a

darci ragione dell'andamento del tifo endemico di una località, a spiegarcene i caratteri, la fisionomia. Essa ci spiega come molte città, pur dotate di ottima e copiosissima acqua, pure fornite di una fognatura quanto mai estesa e ben funzionante, vedano tuttavia nel loro seno perdurare ostinatamente il tifo in una misura considerevole: in queste condizioni è appunto Roma.

Con la teoria contagionistica soltanto si può spiegare l'andamento normale del tifo in Firenze, come l'esame delle cifre e dei dati surriportati ampiamente ci dimostra.

Una semplice occhiata ai cartogrammi della morbilità e mortalità ci mostra che i distretti più colpiti sono il 1° e il 3° a preferenza, il 4° e il 9°. Prendiamo dunque a soggetto di uno studio un po' particolareggiato qualcuno di essi, ad esempio i primi due che sono limitrofi.

Perchè questo maggiore tributo pagato all'infezione tifica dai due distretti?

Abbiamo già assolutamente esclusa l'origine idrica, almeno come causa generale unica o anche principale; vediamo dunque quali altri fattori si possano invocare a spiegazione del fatto.

Se gettiamo uno sguardo sulla carta n. 4, in cui ho segnato i casi di morte per tifo avvenuti nel decennio e la canalizzazione dell'acqua potabile, un fatto ci colpisce subito: ed è il fitto intreccio di strade e straducole nei due distretti indicati, la qual cosa denota l'addensamento della popolazione che in essi si verifica più che altrove.

Se poi prendiamo in esame una carta in cui sia tracciata la rete della fognatura cittadina, possiamo altresì osservare che appunto in questi due distretti vi è predominanza assoluta dell'antica rete di fogne datanti da moltissimi anni e in uno stato tutt'altro che lodevole, come tosto vedremo.

Nella zona più colpita dal tifo, infatti, compresa fra via Calzaioli e il viale Carlo Alberto, dall'Arno alle vie dell'Orivolo, Pietrapiana e Borgo la Croce, di fognatura nuova non vi sono che ben pochi tratti, quali la via del Corso e la metà di via del Proconsolo, dall'incrocio con la precedente alla piazza del Duomo, Borgo degli Albizi, Borgo dei Greci, via del Mercatino di San Piero, via dei Leoni e dei Castellani, via de' Pandolfini nel tratto che va da via del Mercatino a via G. Verdi, le vie G. Verdi e dei Benci, piazza Santa Croce, la via da Verrazzano e dell'Agnolo, via de' Macci, via de' Malcontenti e dei Tintori, ossia in tutto circa metri 4675 solamente, un nulla di fronte a tutto lo sviluppo stradale di questi quartieri (1).

(1) Dati attinti direttamente all'ufficio tecnico del Comune.

Di queste nuove fogne la maggior parte risalgono a 10 o 12 e più anni fa; qualche piccolo tratto è stato eseguito solo in questi ultimi 5 anni.

Le fogne della rete antica (la nuova fognatura essendo stata approvata nel 1873), sono superficiali, di forma rettangolare, di dimensioni molto piccole, mal coordinate fra loro, ricche di cretti e fenditure; non avevano altro scopo che di versare in Arno le acque meteoriche (V. la pubblicazione ufficiale del dott. L. Castelli dell'ufficio d'igiene municipale: *La popolazione e la mortalità del centennio 1791-1890: studi e rapporti con la salute pubblica nel biennio 1891-1892*). La fognatura anche attualmente, del resto, non serve che per lo scolo delle acque di pioggia ed in parte per quello delle acque domestiche (V. *Annuario statistico del comune di Firenze* per il 1903). Nei canali sotterranei, ove circola di continuo l'acqua, è permessa l'immissione delle materie escrementizie passanti per fossa Mouras o fossa mobile. Ma si noti che ogni giorno il personale dell'ufficio tecnico ha occasione di riscontrare, nelle ispezioni che vengono eseguite, dei pozzi neri comuni a sfioratore; e non è escluso dai suoi componenti il dubbio fondatissimo che ci siano tuttora, nel vecchio centro specialmente, dei pozzi a smaltitoio, sebbene rigorosamente proibiti.

In questi due distretti, finalmente, la vita cittadina si esplica da secoli e secoli, in condizioni fino a pochi anni addietro tutt'altro che igieniche; e non è a dire quale inquinamento presenti in essi il sottosuolo. Basta il pensare che mancavano latrine pubbliche e ne facevano le veci tutti i vicoli stretti ed oscuri così frequenti nel centro della città; mancavano od erano insufficienti, oltrechè in pessimo stato, le fogne, che spesso producevano allagamenti per rigurgito; non erano incanalate le acque piovane; dei pozzi neri nessuno era a perfetta tenuta, ma tutti costruiti in semplice muratura; in gran parte erano in uso gli smaltitoi. E in questo sottosuolo sono scavati i pozzi che tuttora alimentano una discreta parte della popolazione nei due distretti in parola.

Ho detto che nei due distretti centrali 1° e 3° si addensa maggiormente che per tutto altrove la popolazione, e specialmente nel distretto 3°, composto nella grande maggioranza di povera gente.

Il confronto tra questi due distretti con i limitrofi 2, 5 e 6, in riguardo alla densità di popolazione, riescirebbe a questo proposito molto istruttivo. Ho perciò voluto farlo, servendomi dei seguenti criterî e dati, in mancanza (come ho detto più sopra) di dati statistici diretti sulla popolazione dei distretti, nonchè di dati sulla superficie loro.

L'Annuario statistico per il 1903 sopra citato porta in un quadro la popolazione presente censita al 10 febbraio 1901, distinta per parrocchie. Servendomi di questo quadro, io ho riunito insieme tutte le parrocchie appartenenti ad uno stesso distretto medico, e per quelle divise in due distretti ho pure diviso la popolazione loro assegnata in parti proporzionali, valendomi di indicazioni attinte alle parrocchie stesse; cosicchè ho potuto, per lo meno in modo approssimativo, ottenere la popolazione dei distretti così ricostruiti, riferita al censimento del 10 febbraio 1901, e con una semplice proporzione l'ho riportata alla media del decennio. La loro superficie ho ricavato con molta approssimazione da misure eseguite su di una carta topografica, su cui avevo tracciato i limiti dei distretti stessi.

I risultati ottenuti relativamente a due dei distretti più colpiti (1 e 3) e altri dei meno colpiti e limitrofi (2, 5 e 6), sono esposti nel quadro seguente:

Quadro XXIX.

	Distretti medici				
	1	3	2	5	6
Superficie approssimativa . . . Ettari	49	23	58	105	134
Popolazione approssimativa (media del decennio).	17,756	12,008	14,122	13,670	18,342
Densità di popolazione per ettaro. . .	362. 3	522. 1	243. 4	130. 0	137. 5
Casi di tifo per 10,000 abitanti (media annua).	15.09	23. 56	11. 04	12. 07	10. 19
Morti di tifo per 10,000 abitanti (media annua).	3. 38	4 91	2. 47	2. 48	2. 51

Quello che ci colpisce in questo quadro è la correlazione che evidentemente esiste fra l'addensamento di popolazione e la maggior morbilità e mortalità per tifo. Infatti, nei distretti più colpiti (1 e 3) l'addensamento è maggiore (da 362 a 522 abitanti per ettaro); in quelli meno colpiti, anche l'addensamento della popolazione è assai minore, e cioè di 243 abitanti per ettaro nel distretto 2 e soltanto di 130 e 137 nei distretti 5 e 6. E in relazione con queste cifre, stanno i casi di tifo denunziati (che, ripeto, possono dare un'idea approssimativa esatta, per quanto siano inferiori al vero numero dei casi verificatisi), e più che altro i casi di morte per tifo avvenuti nei singoli distretti messi a confronto; e così, mentre nei due distretti 1 e 3 si hanno cifre di morbilità di 15 e 23 per 10,000 abi-

tanti e di mortalità di 3,4 e 5 circa, come media annua calcolata sul decennio, negli altri distretti invece (2, 5 e 6) la morbilità oscilla dal 10 al 12 circa per 10,000 abitanti e la mortalità intorno al 2. 5 circa.

Da notare ancora in questo prospetto è il maggiore contributo che dà all'infezione tifica il distretto 3, anche sopra il limitrofo distretto 1; e ciò in relazione coll'addensamento anche maggiore della popolazione, la maggior miseria, le condizioni generali più infelici e più antigieniche. Per contro, il minore affollamento, le maggiori aree stradali e quelle adibite a piazze, giardini, ecc., le costruzioni più recenti, la nuova fognatura e la canalizzazione generalizzata negli altri distretti, specialmente in quelli della periferia sulla destra dell'Arno, portano con sè la minore morbilità e mortalità.

Questo ci dimostrano le cifre suesposte per i distretti 2, 5 e 6 e altrettanto fa il semplice esame della carta della ripartizione delle morti per tifo nel decennio e della conduttura dell'acqua potabile.

E se nel distretto 2 e analogamente ad esso e in maggior misura, nel distretto 4, possiamo notare un qualche focolaio di certa importanza dell'infezione tifica, questo si riscontra a preferenza in quelle strade dei due distretti in parola, costituite da gruppi di abitazioni antiche e affollate, popolate da povera gente, con un sottosuolo in cattive condizioni, con fognatura antica, oppure in istrade in cui esistono forti agglomerazioni di individui, come caserme, ricoveri, ospedali. A misura che ci si allontana dal centro verso la periferia della città, i casi d'infezione in essi si diradano.

Nè a questo principio generale contraddice quanto mostra la carta n. 4, nella quale si possono osservare nel distretto 4 tre focolai importanti precisamente alla periferia, proprio sui viali di cintura o ben vicino: uno cioè sul viale Filippo Strozzi presso la Fortezza da Basso, l'altro in cima di via San Gallo presso piazza Cavour e il terzo nella stessa via di San Gallo, a poca distanza dal precedente e dal viale Principessa Margherita. Nel primo caso si tratta di una caserma (19° reggimento artiglieria); il secondo focolaio è dato dall'Ospedale militare, in cui si ebbero diversi casi interni, da un lato della strada e dall'altro dall'Istituto delle Mantellate; il terzo punto rammentato è l'Ospedale di Bonifazio, che ricovera cronici, oftalmici e tubercolosi, ed ebbe pure diversi casi interni. Nel distretto 7 si vede pure un focolaio verso il viale Principe Umberto o cioè nell'ultimo tratto di via della Scala: orbene, qui ha sede il 3° reggimento genio, che nel periodo studiato ha fornito un discreto numero di ammalati di tifo con due morti; e altri casi, pure con due morti, si sono avuti in un'abitazione attigua alla caserma.

Il maggior tributo pagato al tifo sta poi in relazione, come è ben naturale, con la maggiore mortalità generale che si verifica

nei centri più affollati. Se diamo, infatti, uno sguardo alle cifre di mortalità generale ripartita per strade, possiamo osservare che le più alte sono in generale raggiunte là appunto dove la popolazione è più densa; epperò, sempre prendendo in esame i distretti 1 e 3 in confronto col 2, 4, 5 e 6, a preferenza nei primi due rispetto agli altri.

Per avere però un prospetto di questa fatta mi sarebbero occorsi molti dati richiedenti un lavoro lungo e laborioso per parte dell'ufficio di anagrafe, cosa che non ho ardito di richiedere; ma, tanto per avere un'idea di quello che in realtà si verifica, possono servire le cifre ricavate dalla relazione già citata del dott. Castelli, relative alla popolazione residente in Firenze al 31 agosto 1892, desunta dagli stati di famiglia esistenti nell'ufficio di anagrafe e distribuita per ciascuna strada (prospetto 5°, a pag. 100), divisa in stabili e famiglie. Facendo, sulla scorta di questi dati, la percentuale di abitanti per gli stabili di una data strada, si ottiene come risultato un maggiore affollamento in genere nel distretto 3 e nell'1, in confronto dei distretti limitrofi 2, 4, 5 e 6; in relazione al quale affollamento sta la maggiore mortalità delle strade più dense di popolazione in paragone con quelle che si presentano meno affollate.

Così, per esempio, fra le vie che mostrano maggiore addensamento di popolazione nel 3° distretto, ci sono:

la via dell'Agnolo col 21.6 % di abitanti per stabile e il 15.5 ‰ di mortalità generale;

la via Borgo Allegri col 23.7 % di abitanti per stabile e il 15 ‰ di mortalità generale;

la via dei Pepi col 21.3 % di abitanti per stabile e il 12 ‰ di mortalità generale;

la via dei Macci col 18.3 % di abitanti per stabile e il 14.1 ‰ di mortalità generale, ecc., e queste vie sono appunto quelle che si mostrano più colpite dal tifo.

Chè se via Ghibellina, via de' Malcontenti, il Corso dei Tintori, mostrano con un affollamento assai minore (17.7, 14.5, 14.2) una mortalità generale molto forte (dal 17 al 26 ‰) e una mortalità per tifo delle più alte, si deve tener presente il fatto che in via Ghibellina vi è la Prigione delle Murate, in via de' Malcontenti la Pia Casa di lavoro e parecchi altri ricoveri, in Corso dei Tintori parecchie caserme, locali tutti densissimi di popolazione, e che dànno quasi da soli tali quozienti di mortalità.

Ed ora, esaminando un po' più davvicino la carta della distribuzione dell'acqua potabile municipale (ultimo punto che ci resta da considerare di quelli enunciati), vediamo che la conduttura non è in rapporto alcuno con la ripartizione dei casi di tifo, come del resto le cifre già avevano dimostrato.

Il maggior numero dei casi di tifo potuti appurare nel decennio, il maggior numero dei morti, si riscontrano indifferentemente per

riguardo all'approvvigionamento di acqua in tutte le strade dei quartieri più affollati, unicamente in ragione dell'addensamento della popolazione, come sopra abbiamo veduto. È perciò che nella carta n. 4 possiamo osservare il maggior numero di casi di morte segnati nei distretti 1, 3, 9, parte del 4, tutti corrispondenti alla parte più affollata e più antica della città, mentre le zone periferiche nuove sulla destra dell'Arno si mostrano ben poco colpite, nonostante i nuovi quartieri siano tutti completamente o quasi canalizzati. Chè se l'acqua di conduttura fosse in qualche modo compromessa nella diffusione del tifo, si dovrebbe avere, per lo meno nella stessa misura, l'infezione tifica anche in questi quartieri, dove l'acqua municipale è in maggior copia distribuita e consumata.

Nel quadro che segue ho riunito, a dimostrazione di quanto sopra ho esposto, un certo numero di strade prese fra quelle del centro, nelle quali esiste il maggior numero di concessioni d'acqua potabile ai privati e altre, pure del centro, prive di canalizzazione in tutto o in parte; a ciascuna di esse ho messo allato il numero delle concessioni d'acqua ai privati; il numero degli stabili che le compongono; per ogni stabile la percentuale di abitanti, riferendomi perciò alle cifre della relazione Castelli; finalmente il numero dei malati e morti per tifo nel decennio in cifre assolute e percentuali.

Avverto ancora che i dati relativi alla canalizzazione e concessioni di acqua ai privati mi sono stati forniti dal servizio dell'acqua potabile municipale.

Ed ecco quello che tale prospetto ci dimostra:

QUADRO XXX.

Vie completamente canalizzate	Numero delle concessioni d'acqua	Numero degli stabili	Numero degli abitanti per stabile %	Casi di tifo	Morti per tifo	Casi di tifo per % stabili	Morti di tifo per % stabili
Via Calzaioli	19	13	19.6	6	1	46.1	7.7
» del Corso	31	20	18.3	5	1	25.0	5.0
» del Proconsolo . .	20	19	15.5	6	4	31.5	21.0
» degli Albizi . . .	24	31	15.8	6	..	19.3	..
» Giuseppe Verdi .	21	24	17.7	2	2	8.3	8.3
» dell' Anguillara .	18	23	18.3	1	..	4.3	..
» dei Benci	22	25	22.2	6	..	24.0	..
» Borgo S. Croce . .	8	17	25.0	7	2	41.2	11.7
» dei Neri	40	32	24.4	7	..	21.8	..
» dei Tintori . . .	53	64	14.2	53	14	82.8	21.8
» dei Malcontenti .	25	35	14.5	24	8	68.5	22.8
» Ghibellina . . .	88	85	17.7	29	5	34.1	5.8
» dell'Agnolo . . .	41	100	21.6	30	6	30.0	6.0
» Pietrapiana . . .	52	60	15.7	7	..	11.6	..
Vie canalizzate . .	**462**	**548**	**18.6**	**189**	**43**	**34.4**	**7.8**

Vie prive di canalizzazione in tutto o in parte	Numero delle concessioni d'acqua	Numero degli stabili	Numero degli abitanti per stabile %	Casi di tifo	Morti per tifo	Casi di tifo per % stabili	Morti di tifo per % stabili
Via dell'Oche . . .	..	11	17.8	2	..	18.2	..
» S. Elisabetta . .	..	9	24.0	3	1	33.3	11.1
» dello Studio . .	..	6	13.4	2	..	33.3	..
» Condotta . . .	..	11	12.1	1	1	9.1	9.1
» Magalotti . . .	..	7	11.0	1	..	14.3	..
» delle Brache . .	..	7	10.5	1	1	14.3	14.3
» Cornacchiaia .	..	3	16.0	3	..	100.0	..
» dell'Ulivo . . .	..	27	18.5	5	1	18.5	3.6
» Michelang. Buonarroti	in parte	34	18.6	11	3	32.3	8.8
» Borgo Allegri . .	..	95	23.7	33	7	34.7	7.3
» dei Macci . . .	..	69	18.3	23	7	33.3	10.1
» di Mezzo . . .	..	40	15.1	10	1	25.0	2.5
Vie poco o punto canalizzate.	..	**319**	**16.6**	**95**	**22**	**29.7**	**6.8**

Si vede dunque da queste cifre che la differenza in totale fra vie completamente canalizzate e con gran numero di concessioni di acqua ai privati e vie non canalizzate affatto o ben poco e quindi senza o con scarse concessioni di acqua, non è grande per quello che riflette morbilità e mortalità per tifo, le quali al contrario sono in rapporto piuttosto colla densità di popolazione; e non solo, ma dobbiamo osservare anche il fatto che due fra le vie canalizzate che dànno maggiore morbilità e mortalità sono precisamente quelle già più sopra accennate, dei Tintori e dei Malcontenti, la prima con due caserme, la seconda con diversi ricoveri e la Pia Casa di lavoro. Se togliamo queste due strade dal totale e facciamo la media sulle altre (che meglio si prestano ad un confronto per non avere simili locali di densa popolazione e in condizioni speciali di tenore di vita), vediamo sparire la lieve differenza in più non solo, ma scendere morbilità e mortalità al disotto di quelle delle vie non canalizzate; poichè, infatti, la morbilità da 34.4 % scende a 24.9 e la mortalità dal 7.8 si riduce al 4.6 %.

***

Da quanto ho esposto, risulta adunque che la febbre tifoide è in quest'ultimo decennio notevolmente scemata in Firenze, riducendosi la mortalità per essa da 7.88 a 3.16 per 10,000 abitanti.

Tale mortalità è però sempre troppo elevata. Infatti, paragonando la nostra città con le principali città italiane ed estere, abbiamo che Firenze occupa in Italia il terzo posto nella scala della mortalità per tifo, essendo oggi superata soltanto da Milano e da Roma; nel confronto poi con le principali città estere europee, è lasciata indietro solamente da Madrid.

Questo ci dimostra il seguente quadro, che dà la mortalità per tifo relativa a 100,000 abitanti, quale è risultata nel quinquennio 1899-903; le cui cifre io ho ricavato dall'accuratissima e documentata pubblicazione statistica della città di Amsterdam per il 1904: *Statistiek der Bevolking van Amsterdam en eenige voorname steden der wereld in de jaren 1899-1903;* accanto vi ho messo, per confronto dei progressi, rispettivamente fatti da ognuna delle città elencate, nella lotta contro il tifo, le cifre indicanti la mortalità nel quinquennio 1881-85 per le città estere e nel quadriennio 1881-84 per le città italiane, ricavate dalla pubblicazione del 1886 della Direzione generale della statistica del Regno: *Risultati dell'inchiesta sulle condizioni igieniche e sanitarie del Regno.*

QUADRO XXXI. — *Mortalità per tifo delle principali città italiane ed estere.*

(1899-903; 1881-85).

CITTÀ ITALIANE	1899-903 — Morti per 100,000 abitanti	1881-84 — Morti per 100,000 abitanti	CITTÀ ESTERE	1899-903 — Morti per 100,000 abitanti	1881-85 — Morti per 100.000 abitanti
Milano	46.00	90.00	Madrid.	55.28	72.00
Roma.	41.02	44.00	Parigi	22.58	92.00
Firenze	30.38	60.00	Bruxelles.	17.20	29.00
Bologna *	28.30	68.00	Londra.	13.54	24.00
Venezia **.	25.10	57.00	Budapest.	13.40	40.00
Genova	21.34	55.00	Amsterdam	9.68	21.00
Torino	21.04	91.00	Zurigo.	7.92	21.00
Napoli	13.88	78.00	Dresda.	5.62	19.00
Palermo.	11.14	131.00	Vienna.	4.72	18.00
			Berlino.	4.12	31.00
			Monaco	4.08	18.00

* Media del triennio 1899-901-902. — ** Media del quadriennio 1899-902.

I vantaggi adunque conseguiti finora, che effettivamente non sono piccoli nè da disprezzarsi, ci debbono sempre maggiormente spronare a mettere in opera quanto è da noi per continuare ad abbassare ancora il quoziente di mortalità specifica, suscettibile tuttavia di forte diminuzione.

I provvedimenti da prendere a quest'uopo sono molti; e riguardo ad essi le due teorie, che dividono gli epidemiologi, debbono scomparire per fondersi in un unico insieme, da cui derivare il codice delle misure destinate a combattere l'infezione tifica.

La lotta contro di questa deve dunque farsi prendendo di mira, da un lato il germe che origina la malattia per distruggerlo nella misura del possibile, dall'altro rendendogli l'ambiente il meno propizio alla sua vita fuori dell'organismo ammalato e alla sua diffusione, e garantendo questo ambiente da ogni inquinamento.

Il maggior pericolo, invero, per la diffusione della febbre tifoide è rappresentato dall'ammalato, per mezzo dei rapporti più o meno diretti che esso ha con gli altri individui.

Effettivamente, dalle cognizioni che abbiamo sul bacillo di Eberth, dobbiamo ritenerlo probabilmente come un parassita obbligato e incapace, per quello che oggi si sa, di resistere per molto tempo nell'ambiente esterno, specialmente senza perdere del suo potere patogeno. È vero che si è creduto fino a non molto tempo fa che il bacillo del tifo potesse vivere lunghi mesi nelle acque, e più ancora nel terreno; ma oggi è provato al contrario che esso resiste nell'acqua assai poco, tanto che da essa ben difficilmente si può isolare e soltanto in quei casi in cui vi pervenga in modo per così dire continuo. Nel terreno pure, sebbene in questo mezzo la sua resistenza sia molto maggiore che nell'acqua, il bacillo del tifo non vivrebbe più di alcuni mesi nelle migliori circostanze, poche settimane per lo più. Sensibilissimo al disseccamento, resiste invece molto nelle materie fecali, perchè queste offrono una grande difficoltà ad essere essiccate, ed a questo fatto è dovuta la sua resistenza nel terreno, in cui perviene per la massima parte appunto per mezzo delle materie fecali dei malati.

Che il bacillo del tifo possa vivere nell'ambiente esterno una lunga vita saprofitica senza perdere delle sue proprietà patogene o mantenendosi capace di riacquistarle a un dato momento, oggi allo stato delle nostre cognizioni non si può ammettere.

Troppo poco sappiamo dei rapporti che si passano fra specie di microrganismi patogeni e simili non patogeni molto diffuse; dimodochè per quanto verosimili appaiano tali relazioni, che renderebbero assai facile a spiegarsi l'origine autoctona di una infezione, altrettanto scarse e mancanti sono le prove che possiamo addurre a sostegno di una tale ipotesi.

Lo stesso Koch, che prima riteneva il bacillo del tifo capace appunto di vivere lungamente quale saprofita nell'acqua e più ancora nel terreno, dove si sarebbe in certe condizioni potuto anche moltiplicare, oggi ha completamente cambiato di parere; e paragona per questo lato il bacillo del tifo al vibrione colerigeno.

Per la prima parte dei provvedimenti adunque, data la grande parte che spetta al malato come sorgente e veicolo d'infezione, occorrerà anzitutto ottenere dai medici curanti la denunzia di tutti i casi di tifo, non solo di quelli dichiarati e indubbi, ma anche di quelli sospetti e dei casi lievissimi, che ora passano tutti o quasi ignorati, per potere, previe le ricerche di laboratorio che del caso, procedere all'isolamento del tifoso e ad una rigorosa, continua disinfezione di tutto ciò che da esso proviene e con esso ha avuto contatto, quindi in modo speciale le feci, le urine, gli sputi, le biancherie di dosso, di letto, gli oggetti d'uso, ecc., ecc., perchè tutti possono essere veicoli di diffusione della malattia.

A causa del nessun isolamento in cui è tenuto generalmente il tifoso, specie nelle case della povera gente, si verificano molti casi della malattia nelle persone che con lui coabitano o che hanno dei rapporti con lui o con la famiglia, dando origine ad epidemie famigliari, che costituiscono quella che gli inglesi chiamano *sick-room*

infection, di cui sono stati riportati moltissimi casi, particolarmente in Inghilterra (Peck, Bornträger, ecc.).

Ma non si creda che siano difficili a verificarsi delle epidemie famigliari da puro contagio nelle classi più alte della società, nelle case delle persone ricche, che hanno a loro disposizione per assistere un malato e infermieri e persone di servizio, che alloggiano in quartieri ampi e spaziosi, dove non si può certo parlare di affollamento, nè di mancanza di luce o di aria, dove nulla manca di ciò che può occorrere alla vita, non dal solo punto di vista del necessario ma anche del superfluo: anche in queste case di privilegiati. quando vi sia un tifoso, non è rara, ripeto, la propagazione della malattia a due o tre persone di famiglia per mezzo esclusivo del puro contagio; e difficilmente si troverà un medico che non abbia potuto osservare di tali casi.

Non è così rara, come in generale si crede, la infezione contratta negli ospedali per puro contagio, e che si potrebbe evitare vegliando ad avere una rigorosa pulizia delle latrine e dei vasi che servono ai tifosi e alla disinfezione metodica degli oggetti che hanno servito al loro uso, non esclusi nemmeno i termometri clinici e le cannule per clisteri, stati riscontrati essi pure quali veicoli di tifo (Bormans, Bard e Péhu, Guinon, ecc.). Così, per esempio, nel corso del decennio studiato, oltre a numerose osservazioni registrate di casi avvenuti nella stessa famiglia a intervalli di parecchie settimane l'uno dall'altro, e dopo il primo verificatosi, e quindi non suscettibili di essere ascritti ad altra causa che a quella del contagio, diretto o mediato, ricorderò i casi interni di alcuni ospedali. In S. Maria Nuova si registrarono nel decennio 25 casi interni, quasi tutti nel personale di assistenza, specie nelle serventi (ad eccezione di pochi), con quattro morti; nel settembre 1894 si ebbero tre casi e pure tre casi nell'ottobre del 1897. Quattro casi interni (seguiti da morte) si ebbero tra i cronici dell'ospedale di Bonifazio. Il personale di assistenza dell'ospedale militare diede dieci casi interni, di cui tre seguiti da morte (due soldati dell' 8ª compagnia di sanità e una suora). Di questi casi la maggior parte almeno, se non tutti, si debbono ritenere dovuti con tutta probabilità al contagio.

La trascuratezza, con cui vengono asportate e buttate le deiezioni e le orine dei tifosi, senza aver loro fatto subire una previa disinfezione chimica, è causa precipua della diffusione della malattia. Oltrechè per contatto con particelle di materiale infettante per parte di chi assiste il malato o di chi coabita con lui e lo avvicina, si consideri il caso così frequente in cui feci e orine sono

gettate o nella latrina o, peggio assai (come succede ben di frequente, per non dire abitualmente, in campagna), sul terreno all'aperto. Nel primo caso, una eventuale comunicazione che disgraziatamente esista fra il pozzo nero e il pozzo di acqua di alimentazione e il passaggio dei germi dall'uno nell'altro, una contaminazione per parte di chi eseguisca la vuotatura del bottino, una disseminazione dei germi sugli ortaggi in seguito alla concimazione con quelle materie fecali inquinate, costituiscono altrettante cause di diffusione della malattia. Nel caso dello spargimento delle deiezioni all'aperto, i germi patogeni, oltre al potere eventualmente pervenire nell'acqua del sottosuolo per incompleta filtrazione trascinativi dalle acque meteoriche, possono ancora venire diffusi a distanza più o meno grande, in conseguenza dell'essiccamento delle materie fecali che li contengono e del loro trasporto in minute particelle operato dalle correnti aeree (Germano, Geschwind, Corfield, Cherry, ecc. ecc.); più ancora poi che per questo mezzo, le materie infettanti sparse sul suolo vengono trasportate tutt'attorno dall'uomo che le calpesta e che così dissemina la malattia (Koch ed altri), nonchè da certi animali, specie le mosche che vi si posano sopra e portano poi altrove i germi del tifo, sia attaccati alla superficie esterna del loro corpo, sia nel loro tubo digerente, in cui questi passano inalterati nella loro vitalità e virulenza (Cherry ed altri).

Basta questo poco che ho detto per dimostrare la grande importanza che hanno nella lotta contro il tifo l'isolamento del malato e le disinfezioni.

Superfluo mi pare l'insistere sulla necessità di estendere la sorveglianza rigorosa e continua ai convalescenti e alle stesse persone di famiglia, che notoriamente costituiscono tutti altrettanti veicoli d'infezione.

L'esperienza ci insegna che mediante l'applicazione rigorosa di queste sole misure si può liberare da tale malattia infettiva un'agglomerazione di individui. E da quanto ho detto sopra, sulla parte importante che spetta al tifoso come sorgente di infezione, facilmente lo si capisce. Per la contaminazione delle stesse acque profonde, si è detto esser necessaria l'immissione in esse di materiale infettante proveniente dal malato: reso innocuo quanto dal malato proviene, è resa per conseguenza impossibile qualunque contaminazione delle acque. E non è esagerazione lo stabilire come massima che le acque di alimentazione, per quanto cattive esse siano, non possono dare il tifo a chi ne usa, se non nel caso che esse siano contaminate direttamente o indirettamente da deiezioni di tifosi. La

storia di tutte le epidemie di origine idrica ben provata ci dimostra questo fatto: ma abbiamo pure delle osservazioni altrettanto interessanti al riguardo.

Serva di esempio l'epidemia tifica di Chemillé (Mosny e Bordas), prodotta dalla contaminazione di un'acqua sorgiva per opera di deiezioni di un tifoso; orbene, all'esame della località, fu messa in chiaro una comunicazione di antica data fra un pozzo nero che aveva ricevuto le deiezioni tifose e un lavatoio, la cui acqua servì di intermediario per inquinare l'acqua sorgiva in parola, raccolta in un prossimo bacino comunicante col lavatoio stesso. Nonostante l'infiltrazione continuata di materie fecali nell'acqua, questa non portò mai il tifo in paese, se non quando ricevette materiale tifoso proveniente da un malato. Per un pezzo nelle identiche condizioni si è trovata la nostra galleria filtrante dell'Anconella, in cui la Commissione tecnica del 1886 trovò che erano stati aperti non pochi fognoli di case private, quasi fosse stato un fognone e non una galleria acquifera; e ciò nonostante, essa non originò alcuna epidemia di tifo in città.

Troppo volentieri e con concetto troppo esclusivo si è voluto credere fino ad oggi che bastasse, per garantirsi da questa malattia, provvedere della buona acqua potabile; oggi non ci si può più limitare a questa richiesta, ma è necessario far ben comprendere alle popolazioni e ai loro amministratori che occorrono, oltre a questa importantissima, altre misure di risanamento.

Dopo quanto è stato scritto sulla parte avuta dall'acqua di alimentazione nella diffusione del tifo, sarebbe superflua qualunque parola spesa sull'argomento. Pur volendo evitare le esagerazioni di coloro che all'acqua stessa pretendono di attribuire sempre e dovunque la parte di veicolo unico di tale infezione, bisogna pensare che in realtà per la sua stessa natura è l'acqua appunto quella che con maggiore facilità si presta ad un inquinamento; donde ne risulta la necessità di averla pura e di ben garantirla contro ogni possibile contaminazione: due condizioni indispensabili per un approvvigionamento di acqua potabile, e che purtroppo non si riscontrerebbero, giusta le osservazioni surriferite, nell'acqua che oggi consumiamo. Bisogna poi averla in grande quantità; e più sarà e meglio sarà per la popolazione che ne potrà usufruire, per gli usi domestici non solo, ma anche per i pubblici servizi, contribuendo essa così in modo indiretto a combattere fra le altre malattie anche e specialmente il tifo, col permettere una maggior pulizia e delle abitazioni private e del suolo pubblico e col rendere nel nostro caso realmente e rigorosamente possibile l'abolizione dei pozzi nel perimetro della città, fonti, come abbiamo visto, di infezione. L'ab-

bondanza dell'acqua permetterà pure l'istituzione di numerosi e ben costrutti lavatoi, concorrendo così anche per questo lato a limitare l'infezione dell'acqua e della casa, che ora facilmente si avvera per mezzo della biancheria sporca lavata dalla povera gente nella propria abitazione.

E qui, prima di terminare per ciò che riguarda la provvista di acqua, non posso fare a meno di notare che, sebbene l'opinione troppo esclusiva dei partigiani dell'origine idrica del tifo abbia avuto per risultato di far purtroppo collocare in seconda linea e trascurare perfino qualunque misura profilattica che non concernesse l'acqua di alimentazione, ha però avuto il merito verso l'igiene pubblica di indurre le amministrazioni di molte città e borgate a provvedere tali centri di buona acqua potabile, con grande vantaggio naturalmente della pubblica salute in generale. E questo certamente non è poco. Per la stessa ragione, l'anno scorso giustamente faceva rilevare al Senato francese il ministro della guerra, generale André, a proposito del tifo nell'esercito, che è un errore il ritenere che i soldati bevano dell'acqua fuori di caserma, contraendo così la malattia, perchè più facilmente e di regola il soldato nelle ore di uscita va a consumare del vino o dei liquori; ma che questo errore in pratica è molto utile e raccomandabile, poichè l'autorità militare francese, quando una città si trovi in cattive condizioni igieniche, interdice col pretesto della cattiva qualità dell'acqua di alimentazione osterie, caffè, ecc. alla truppa di guarnigione, finchè il municipio del posto non abbia provveduto ai miglioramenti richiesti.

Finalmente, importanza grandissima nella lotta contro il tifo hanno pure le altre opere tutte di risanamento, quali il diradamento della popolazione dei quartieri poveri, sventrando certi centri d'infezione e di malattia e al loro posto aprendo strade e piazze larghe, ben aereate e soleggiate, costruendo in luoghi adatti case popolari per il ricovero delle classi diseredate; l'impianto di una fognatura razionale, possibilmente ricca di acqua a scolo perenne, che permetta di allontanare immediatamente tutti i rifiuti della vita cittadina, fonti e veicoli di malattia; la sorveglianza e il regolamento del trasporto delle materie escrementizie e di rifiuto, acciocchè non riesca dannoso, se fatto malamente; l'applicazione rigorosa di un regolamento sulla costruzione e manutenzione dei pozzi neri; ecc. ecc.

Altre misure, la cui applicazione spetta, come per le precedenti, alle amministrazioni, sono quelle relative alla sorveglianza dei mercati e delle derrate alimentari: specialmente di quei generi che l'esperienza ha dimostrato poter farsi veicoli del tifo, e quindi degli erbaggi, del latte, delle ostriche.

Dall'applicazione di tutti questi provvedimenti si ritrarranno dei vantaggi almeno altrettanto apprezzabili quanto quelli ottenuti dalla sorveglianza delle acque di alimentazione.

La storia documentata del tifo in questi ultimi decenni sta a provarci la verità di queste asserzioni: il tifo non è veramente scemato se non in misura delle complesse opere di risanamento eseguite nelle varie città, comprendenti appunto e la provvista di buona acqua potabile e l'impianto di una buona fognatura e lo sfollamento dei quartieri più densi, e l'applicazione rigorosa delle misure di disinfezione, ecc. ecc.

È classico l'esempio di Monaco, che, dopo la provvista di acqua potabile salubre e pura, non vide che un miglioramento nella mortalità per tifo, che in quei tempi raggiungeva l'enorme cifra di 2: per 10,000 abitanti, e soltanto riuscì ad avere ragione di tale malattia quando ebbe risanato il suolo cittadino. E per citare un qualche esempio in casa nostra, ricordiamoci che Milano e Torino, ma sopra tutto Palermo, hanno potuto vedere la loro mortalità rispettiva scendere da 10.1, 9.1 e 13.1 per 10,000 abitanti, quale era prima delle opere di risanamento, alle cifre di 4.6, 2.1 e 1.1 a risanamento compiuto.

La stessa nostra città ci conferma, con l'andamento dell'infezione tifica, che il modo di combatterla con la certezza della vittoria sta precisamente nell'applicazione di tutte quante le misure sopra enunciate.

Firenze, febbraio 1905.

Prospetto 1° — *Morbilità tifica in cifre assolute (popolazione civile e militare) di Firenze nel decennio 1894-903.*

ANNI	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre	Totali
1894	3	11	12	8	9	12	19	38	30	33	29	20	224
1895	13	4	2	7	9	11	19	9	27	35	33	8	177
1896	10	5	2	4	14	9	16	9	18	39	19	19	164
1897	19	6	13	13	14	14	36	60	63	42	40	24	344
1898	12	3	5	8	11	10	22	43	64	104	54	30	366
1899	16	10	13	16	11	17	26	45	52	47	21	8	282
1900	3	6	4	19	21	28	45	39	56	41	108	43	413
1901	16	11	7	10	9	11	21	44	44	51	31	15	270
1902	15	15	20	17	12	12	28	52	40	34	43	12	300
1903	8	14	10	13	17	13	23	33	32	30	36	32	261
Decennio .	**115**	**85**	**88**	**115**	**127**	**137**	**255**	**372**	**426**	**456**	**414**	**211**	**2.801**

Prospetto 2° — *Morbilità tifica ospitaliera (civile e militare) in cifre assolute, di Firenze nel decennio 1894-903.*

ANNI	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre	Totali
1894	..	3	2	5	..	6	7	9	11	12	11	6	72
1895	2	1	..	5	4	3	7	5	14	6	15	1	63
1896	3	1	..	1	6	1	9	1	10	20	10	11	73
1897	3	1	8	9	5	8	13	26	36	29	20	15	173
1898	6	2	2	4	6	6	8	24	31	63	32	20	204
1899	9	7	8	7	5	9	16	27	30	27	14	5	164
1900	1	3	2	7	3	12	20	18	28	25	44	24	187
1901	6	5	3	1	3	5	10	29	24	25	16	8	135
1902	3	6	6	10	5	5	13	23	22	16	15	6	130
1903	5	3	3	5	6	7	9	9	16	18	25	15	121
Decennio .	**38**	**32**	**34**	**54**	**43**	**62**	**112**	**171**	**222**	**241**	**202**	**111**	**1.322**

PROSPETTO 3°. — *Mortalità tifica in cifre assolute (popolazione civile e militare) di Firenze, nel decennio 1894-903.*

ANNI	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre	Totali
1894	2	3	4	4	3	5	3	10	9	7	5	2	57
1895	3	4	2	4	3	3	2	9	4	7	7	2	50
1896	6	3	1	2	4	4	4	3	5	7	8	8	55
1897	6	4	3	4	2	3	13	13	16	11	12	4	91
1898	3	..	1	3	1	3	3	10	12	11	10	8	65
1899	5	4	5	4	3	3	7	9	11	7	6	3	67
1900	3	2	..	1	5	4	7	8	10	4	13	15	72
1901	11	4	2	3	3	1	4	8	5	4	3	5	53
1902	2	8	5	5	4	1	3	3	5	4	11	8	59
1903	..	2	5	2	5	5	3	12	7	6	7	7	61
Decennio	**41**	**34**	**28**	**32**	**33**	**32**	**49**	**85**	**84**	**68**	**82**	**62**	**630**

PROSPETTO 4°. — *Mortalità tifica ospitaliera (popolazione civile e militare), in cifre assolute, di Firenze, nel decennio 1894-903.*

ANNI	Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre	Totali
1894	..	1	..	4	..	1	3	4	3	3	2	1	22
1895	1	..	1	2	1	..	1	3	1	4	3	..	17
1896	3	1	1	..	3	2	3	..	2	5	3	6	29
1897	1	1	1	3	1	2	5	4	8	8	3	..	37
1898	..	..	1	1	..	..	2	4	7	4	6	2	27
1899	4	3	3	2	2	..	3	5	6	2	1	3	34
1900	3	1	..	..	..	1	3	3	5	3	7	7	33
1901	3	2	1	..	..	..	2	5	3	2	2	3	23
1902	..	2	1	3	1	1	1	1	2	3	3	3	21
1903	..	..	3	1	..	..	1	4	2	2	..	4	17
Decennio	**15**	**11**	**12**	**16**	**8**	**7**	**24**	**33**	**39**	**36**	**30**	**29**	**260**

Prospetto 5° — *Morbilità tifica in cifre assolute della città e comune di Firenze (popolazione civile e militare) per distretti medici.*

ANNI	Distretti medici																		Totali
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1894	20	6	20	55	14	12	5	14	10	16	17	7	3	3	2	11	6	3	224
1895	18	7	14	32	9	6	15	6	8	4	13	2	8	5	..	6	10	12	175
1896	9	9	18	21	10	7	13	14	13	3	9	6	5	8	1	7	3	7	163
1897	26	23	34	30	20	21	20	33	24	12	15	28	18	6	1	8	12	10	341
1898	47	20	36	55	26	24	17	4	14	14	8	4	6	13	2	13	35	26	364
1899	30	20	28	22	14	16	22	28	12	14	9	4	8	5	3	5	31	29	280
1900	37	22	55	32	17	29	20	17	30	17	38	5	16	5	4	13	19	32	408
1901	20	10	24	23	19	31	11	9	25	12	9	24	12	9	1	10	10	10	269
1902	32	21	27	26	19	24	10	9	21	9	33	26	14	2	1	8	8	9	299
1903	29	18	27	20	17	17	14	7	24	14	11	22	3	7	3	10	3	15	261
Decennio . . .	**268**	**156**	**283**	**316**	**165**	**187**	**147**	**141**	**181**	**115**	**162**	**128**	**93**	**63**	**18**	**91**	**137**	**133**	**2,784**

N. B — Mancano 17 casi non potuti assegnare a distretto, 4 perchè senza fissa dimora e 13 per mancata indicazione dell'abitazione.

PROSPETTO 6° — *Morbilità tifica ospitaliera in cifre assolute della città e comune di Firenze (popolazione civile e militare) per distretti medici.*

ANNI	Distretti medici																		Totali
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1894	9	2	8	17	4	4	1	7	4	5	1	5	..	..	1	3	1	..	72
1895	10	2	7	14	7	1	4	3	2	1	3	..	2	..	..	2	..	3	61
1896	4	11	8	8	3	3	1	9	7	1	3	2	3	3	..	4	1	1	72
1897	12	13	23	19	11	9	2	25	9	8	8	7	10	..	..	6	6	2	170
1898	25	14	31	34	17	12	7	2	7	9	2	4	3	5	1	9	17	3	202
1899	17	17	21	15	8	8	9	20	7	11	2	3	5	1	1	3	7	7	162
1900	25	10	32	18	10	11	3	8	20	9	6	3	5	5	2	5	3	7	182
1901	9	4	10	9	9	17	6	7	19	10	6	11	1	2	1	5	3	5	134
1902	16	8	12	14	9	10	2	7	12	5	5	11	8	..	1	5	3	1	129
1903	16	10	15	10	10	7	1	3	15	11	2	9	1	1	2	2	2	4	121
Decennio	**143**	**79**	**167**	**158**	**88**	**82**	**48**	**91**	**102**	**70**	**38**	**55**	**38**	**17**	**9**	**44**	**43**	**33**	**1,305**

N. B. — Mancano 17 casi come nel quadro precedente.

Prospetto 7° — *Mortalità tifica in cifre assolute della città e comune di Firenze (popolazione civile e militare) per distretti medici.*

Anni	Distretti medici																		Totali
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1894	4	2	8	10	2	7	3	4	4	3	3	1	1	..	..	1	2	2	57
1895	3	7	5	6	..	2	3	2	1	1	7	..	3	2	..	3	2	3	50
1896	7	4	6	7	4	3	2	3	6	2	3	2	1	2	..	..	..	2	54
1897	9	5	8	5	6	7	8	8	7	2	7	8	6	1	..	..	1	3	91
1898	9	1	9	9	7	4	2	..	5	3	...	..	1	5	..	1	6	3	65
1899	6	4	3	6	4	3	8	9	6	3	3	..	..	1	1	2	4	3	66
1900	8	3	8	8	1	4	5	2	10	6	3	3	3	1	..	3	..	2	70
1901	1	4	3	4	3	6	2	3	6	3	2	7	6	..	1	1	..	1	53
1902	4	2	5	9	3	4	5	4	5	1	7	3	1	1	1	2	1	1	59
1903	9	3	4	4	4	6	7	2	1	5	2	5	1	1	1	2	..	4	61
Decennio . . .	**60**	**35**	**59**	**68**	**34**	**46**	**45**	**37**	**51**	**29**	**37**	**29**	**23**	**14**	**4**	**15**	**16**	**24**	**626**

_NB._ Mancano 4 casi, perchè non potuti assegnare a distretto, 1 perchè senza fissa dimora e 3 per mancata indicazione di abitazione.

Prospetto 8° — *Mortalità tifica ospitaliera in cifre assolute della città e comune di Firenze (popolazione civile e militare), per distretti medici.*

ANNI	Distretti medici																		Totali
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1894	2	1	4	6	1	1	..	2	2	..	..	1	..	..	..	1	..	1	22
1895	2	1	2	4	..	..	..	1	..	..	3	..	2	..	..	1	..	1	17
1896	4	3	4	1	2	1	1	3	4	..	1	2	1	1	..	..	..	..	28
1897	4	2	4	2	2	1	1	3	4	2	4	3	3	..	..	..	1	1	37
1898	1	..	8	2	3	3	1	..	1	2	..	..	1	2	..	1	2	..	27
1899	3	3	..	2	2	2	2	6	4	3	1	..	..	1	1	1	..	2	33
1900	4	1	5	4	1	1	1	2	6	3	..	1	..	1	..	1	..	..	31
1901	..	1	2	3	2	2	..	1	2	2	2	4	1	..	1	..	..	..	23
1902	1	..	1	4	2	1	1	3	1	..	2	1	..	..	1	2	..	1	21
1903	2	1	2	2	1	2	2	..	..	3	..	1	..	..	..	..	..	1	17
Decennio . . .	**23**	**13**	**32**	**30**	**16**	**14**	**9**	**21**	**24**	**15**	**13**	**13**	**8**	**5**	**3**	**7**	**3**	**7**	**256**

N.B. — Mancano 4 casi, come sopra.

Prospetto 9°. — *Morbilità per tifo della città e comune di Firenze, ripartita secondo l'approvvigionamento di acqua.*

ANNI	Gennaio		Febbraio		Marzo		Aprile		Maggio		Giugno		Luglio		Agosto		Settembre		Ottobre		Novembre		Dicembre		Totali	
	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo
1894.	2	1	2	6	4	7	2	5	1	8	5	5	..	14	6	25	7	17	4	27	4	21	6	12	43	148
1895.	5	7	2	2	..	2	3	4	1	6	5	5	1	15	1	5	1	20	1	34	3	21	2	5	25	126
1896.	2	6	..	5	..	2	1	3	..	9	..	8	1	12	..	8	3	9	11	23	3	8	3	11	24	104
1897.	9	9	3	3	2	4	3	5	4	7	2	7	16	15	25	22	18	35	21	14	20	16	3	11	126	148
1898.	3	5	1	2	1	2	2	3	4	2	2	3	14	4	17	15	21	29	31	56	23	29	6	23	125	173
1899.	5	6	3	3	2	8	7	8	3	6	6	9	13	7	25	12	13	36	13	30	3	14	1	4	91	141
1900.	..	2	5	..	2	..	9	8	10	10	11	8	14	25	13	21	18	30	12	23	52	49	19	15	165	191
1901.	9	9	3	3	2	3	5	4	2	7	3	6	7	12	9	24	7	30	16	31	9	17	4	7	76	153
1902.	4	9	4	10	7	9	8	5	5	6	4	8	11	12	10	38	17	19	5	23	16	27	3	6	94	172
1903.	2	3	10	4	6	3	6	5	9	7	6	6	9	13	19	12	11	15	10	15	12	14	8	24	107	120
Decennio . . .	**41**	**57**	**33**	**38**	**26**	**40**	**46**	**50**	**39**	**68**	**43**	**63**	**84**	**129**	**125**	**182**	**116**	**240**	**124**	**276**	**145**	**216**	**55**	**118**	**876**	**1,476**

PROSPETTO 10°. — *Morbilità per tifo nel solo perimetro della cinta daziaria, secondo l'approvvigionamento di acqua.*

ANNI	Gennaio		Febbraio		Marzo		Aprile		Maggio		Giugno		Luglio		Agosto		Settembre		Ottobre		Novembre		Dicembre		Totali	
	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo	Condotta	Pozzo
1894.	2	1	2	5	4	3	2	4	1	4	5	5	..	9	9	16	7	10	4	18	4	18	6	10	46	103
1895.	4	7	2	2	..	2	3	3	1	3	5	4	1	8	1	5	..	10	1	15	3	11	1	5	22	75
1896.	2	2	..	3	..	1	1	2	..	6	..	5	1	5	..	6	3	6	11	19	3	5	4	8	25	68
1897.	7	4	2	1	2	2	3	4	2	5	1	4	8	11	15	16	16	23	17	10	17	12	3	5	93	97
1898.	1	3	..	1	1	2	2	3	4	1	1	1	11	2	15	11	19	19	34	22	18	17	4	12	110	94
1899.	4	4	3	2	1	7	6	4	3	4	6	7	12	4	23	7	10	14	10	23	3	7	..	1	81	84
1900.	..	1	5	..	2	..	7	7	6	1	9	3	13	11	9	15	12	20	12	18	36	23	16	13	127	112
1901.	4	3	2	..	1	1	4	5	2	4	3	4	6	8	6	14	6	20	13	18	6	11	4	2	57	90
1902.	4	7	4	8	6	8	7	3	3	3	3	5	7	6	11	13	15	11	5	17	9	15	3	5	77	101
1903.	2	2	9	2	6	2	5	1	8	1	6	5	5	3	12	7	8	11	7	13	7	12	6	18	81	77
Decennio . . .	**30**	**34**	**29**	**24**	**23**	**28**	**40**	**36**	**30**	**32**	**39**	**43**	**64**	**67**	**101**	**110**	**96**	**144**	**114**	**173**	**106**	**131**	**47**	**79**	**719**	**901**

LABORATORIO BATTERIOLOGICO E MEDICO-MICROGRAFICO
DELLA SANITÀ PUBBLICA

Profilassi specifica del tifo addominale

per il dott. A. PALADINO-BLANDINI, assistente.

I. — PARTE GENERALE.

Importanza di una profilassi specifica nella lotta contro il tifo.

Atterrite le popolazioni europee dalle stragi storiche che hanno in vario tempo segnato fra di esse lo scoppio e la diffusione epidemica dei morbi esotici, attirata la loro attenzione dagli scienziati sul flagello della tubercolosi, si può dire che in ogni tempo per i primi, ed in tempo recente per quest'ultimo per la sua gran parte tutto lo studio e tutte le preoccupazioni si siano rivolte a prevenire e combattere con un nobile accanimento queste malattie che così impressionante numero di vite sottraevano agli aggregati sociali, trascurando invece, o almeno mettendo in una linea molto subordinata — esempio lampante di quello che può la forza dell'abitudine — un'altra causa di malattia e di morte come il tifo addominale.

Esso, privo di una patria speciale, endemico com'è presso tutte le popolazioni del mondo, le ha siffattamente abituate alla sua presenza che uno, due casi di tifo in un centro abitato non preoccupano più di quello che potrebbero preoccupare uno o due malati colpiti da un'altra grave malattia qualsiasi. Eppure tutti i dati statistici sono là a dimostrare che il morbo col suo andamento subdolo, silenzioso, dando poche volte luogo a qualche piccolo scoppio epidemico, ha tuttavia tale importanza come causa di morte, miete tale un numero cospicuo di vittime, che ad esso in verità più intensivamente di quello che non si faccia d'ordinario, dovrebbe essere rivolta e la mente degli igienisti, e l'attenzione del popolo.

Noi difatti, anche senza la confusione regnata fino a Boissier de Sauvages e per la quale con una parola unica *metriteo* o *febbre putrida nervosa* col tifo vero venivano indicate un complesso di altre malattie febbrili, a lungo decorso e contrassegnate da cospicui fenomeni stuporosi; liberatici ancora dall'errore regnato nel mondo medico fino a Jenner per cui in un fascio unico si mettevano il tifo addominale, con il ricorrente ed il petecchiale; assodatasi la teoria diventata legge del parassitismo nelle malattie infettive concepita dal Bassi in Italia e solo più tardi sviluppata dal Pasteur in Francia; reso possibile con la scoperta di Eberth e con gli ulteriori progressi della batteriologia un più esatto accertamento della diagnosi di vero tifo addominale, siamo tuttavia in grado di dire che le nostre statistiche pure modernamente purgate da tutte queste riferite cause di confusione e di errore, ci dànno delle cifre che non possono lasciare nella indifferenza lo studioso che fa ad esse ricorso.

Così, facendo un confronto fra i morti di tubercolosi e di tifo in Italia durante l'anno 1889 — io tolgo dalla *Epidemiologia* del Celli questo esempio — si vede che su 10,000 abitanti il coefficiente di mortalità per tifo è quasi uguale alla metà (6.88) di quello corrispondente alla mortalità per tubercolosi (14.27); e supera poi il coefficiente medesimo relativo alla mortalità per difterite (6.15) in un periodo di tempo in cui — è bene notarlo — non era ancora venuto il benefico ausilio del siero di Behring a diminuire il numero dei morti per questa malattia. Questa proporzionalità non si mantiene, è vero, per tutte le altre nazioni, ma ciò non toglie che paragonando in esse la mortalità per tifo e per vaiuolo, includendo fra queste nazioni anche l'Austria, gravemente sempre attaccata da quest'ultima malattia, si può in ogni caso vedere l'indice di mortalità per tifo non solo raggiungere, ma superare, fino anche a decuplicarlo, l'indice di mortalità per vaiuolo (Inghilterra: vaiuolo 0.01, tifo 1.91 $^{0}/_{000}$).

Guardando poi alle cifre assolute dei morti per tifo in Italia dal 1887 al 1901 si ha una media annuale di 17,500 individui uccisi da questa infezione, perdita economicamente grave per la nazione quando si pensa che il maggior numero di essi è data da individui sottratti alla società in un periodo della loro età in cui alla società stessa erano già costati delle spese senza che ad essa nulla ancora avessero potuto rendere.

Il danno è reale e per certo non trascurabile, ciò che ha determinato la Germania, auspice Roberto Koch, a iniziare una lotta sistematica contro la malattia, con una serietà di intenti e con una larghezza tale di mezzi finanziari che fanno buona lezione alla miopia di certi economisti, i quali non si accorgono come le spese fatte in pro della tutela della pubblica salute, siano quelle che più possono essere considerate come fruttifere, in quanto che per esse il maggiore contributo che l'attività dei sottratti alle malattie ed alla morte dà alla produzione collettiva, diventa una nuova sorgente di incremento della ricchezza nazionale.

A cominciare dal 1902, sono state stabilite in Germania 5 stazioni sanitarie, poste alla dipendenza dell'Istituto imperiale per le malattie infet-

tive; di esse una è sorta a Treves con una sezione a Merzig, un'altra a Sarrebrück con una sezione a Idar, una terza a Metz con una sezione a Saint-Avold, una quarta a Strasburgo con una sezione progettata (novembre 1903) a Mulhouse, ed una ultima a Landau con una stazione volante a Zweibrücken (1). Denunziato un caso di tifo nel distretto assegnato ad ogni stazione, il personale tecnico ha l'obbligo di accertare innanzi tutto la diagnosi batteriologica della malattia, provvedere all'isolamento dell'infermo in un ospedale, ove si può, oppure nella sua stessa abitazione, disinfettare locali e oggetti d'uso pertinenti all'ammalato, renderne innocui gli escreti, procedere ad una inchiesta sanitaria.

E' questo genere di lotta contro la malattia l'esponente delle mutate opinioni del Koch, il quale, antico sostenitore, dopo il suo viaggio scientifico del 1884 in Egitto e nell'India, della teoria dell'acqua potabile nella diffusione del tifo e del colera, ha ora dato a questo fattore epidemiologico una importanza secondaria, assegnando invece il primo e più essenziale posto alla trasmissione diretta della malattia da uomo a uomo, al contagio (2); e siamo con questo *sistema di Koch*, come si vede, nello stesso campo in cui si agitano tutte le varie legislazioni sanitarie, siamo nè più e nè meno che all'applicazione al tifo delle misure di igiene generale che si adattano a tutte le malattie infettive, con la semplice esagerazione di qualche lato di esse, e, in ogni caso, con l'attestato che nella mente del grande scienziato tedesco si è fatta strada l'idea della necessità di adottare delle misure profilattiche speciali contro il diffondersi di una malattia che si presenta come una delle cause di morte più diffuse e temibili.

Tolto questo io non credo che altro di specialmente utile ci sia nella linea di condotta di recente assunta in Germania, o almeno non credo che essa, pur rappresentando un progresso su quello che al riguardo si fa in tutti gli altri Stati, possa avere nella profilassi della malattia tale valore assoluto da poterla assegnare come modello di ciò che va fatto per opporre un argine sufficiente al diffondersi della infezione.

Anche da noi la denunzia dei casi di tifo è obbligatoria, come è obbligatoria la disinfezione dei locali di abitazione dei tifosi, dei loro effetti d'uso, delle loro fecce; nei grandi centri di popolazione pregevoli opere di risanamento sono state eseguite nel giro di pochi anni; il servizio delle acque potabili, quello dei generi alimentari è attivamente invigilato; e certamente a queste misure igieniche va dato il

(1) TALAYRACH. *La lutte contre la fièvre typhoïde*. Arch. de Méd. et Pharm. milit., 1903, n. 11.
(2) *Die Bekämpfung d. Typhus.*

merito di aver ridotto, assieme allo abbassamento generale della mortalità, il numero dei morti per tifo da più di 20,000 come era fino al 1887 a circa 11,000 per come si è verificato nel 1901. Siamo però ancora ben lungi da quello che dovrebbe essere un risultato ideale, dall'averlo, cioè. portato quasi a zero, come si è verificato, ad esempio, in Inghilterra o in Germania per il vaiuolo, ciò che ci dice che le misure sanitarie adottate non rappresentano ancora un presidio sicuro contro la infezione. Con il *sistema del Koch*, queste misure sono state intensificate, e certo va presa come la documentazione ufficiale di un fatto già da tutti immaginato, l'osservazione di Drigalsky (1) a Saarbrücken che per un caso di tifo denunciato quattro ne accertava esistenti la inchiesta sanitaria che alla denuncia faceva seguito; la lotta è più attiva, e a prima vista potrebbe anche sembrare sufficientemente efficace.

Dal punto di vista teorico, difatti, il malato di tifo è al tempo stesso fine di una infezione avvenuta, e inizio di un'altra che va a sorgere. La seducente teoria di Roux e Rodet che per via scientifica ci riporterebbe alla teoria della autotifisazione di Peter, o a quella pitogenica di Murchison, aspetta ancora la sua autentica dimostrazione; e se attraverso qualche carattere differenziale possiamo risalire dal *b. coli* al b. paratifo *B* (Schottmüller), da questo al b. paratifo *A* (Brion-Kayser), e dal b. paratifo *A* al bacillo di Eberth, è certo però che a nessuno è finora riuscito di trasformare un *b. coli* in bacillo del tifo, e dobbiamo quindi oggi su basi più sperimentali e positive ammettere quello che Budd (2) scriveva fin dal 1873 contro Murchison, e che già Hildebrand (3) nettamente enunciava più di mezzo secolo prima, e cioè che « il tifo è sempre prodotto da contagio, da comunicazione cioè di una materia che, al pari degli altri miasmi contagiosi, provoca nell'individuo sano una febbre particolare, durante la quale svolgesi di nuovo il germe di una malattia simile ». Se, quindi, come consiglia Koch, mettiamo l'ammalato in condizione di non poter ulteriormente propagare ad altri i germi della sua malattia, mancherà a questa la sua essenziale ragione di essere, e di ulteriormente diffondersi.

All'atto pratico però è da tener conto che prima che l'ammalato sia isolato in un ospedale, o nelle baracche Döcker, che pare abbiano tanto bene risposto a Treves, o in casa propria, tutte le volte che gli altri mezzi di isolamento non sia possibile applicare, giusto facendo gran calcolo della efficacia del contagio diretto come vuole Koch, l'ammalato stesso rimasto in libero contatto con le persone che lo avvicinano in un modo o nell'altro

---

(1) *D. Ergebnis. der Bekämp. d. Typhus nach R. Koch.* Centr. f. Bakt., 1904, vol. XXXV, n. 5.

(2) *Typhoid fever, ist nature*, ecc. Londra, 1873.

(3) Vedi la prefazione di Guenau de Mussy al *Trattato sulla febbre tifoidea* di Murchison.

avrà avuto tempo di trasmettere ad altri il germe della sua malattia. Le vie per le quali il bacillo di Eberth può farsi strada all'esterno sono molteplici, e se anche vogliamo ammettere come non dimostrata l'asserzione di Sicard (1) e di Sudakoff (2) che dicono di aver riscontrato il bacillo del tifo rispettivamente nell'aria ispirata e nel sudore dei tifosi, non si può mettere in dubbio la sua presenza nello espettorato nei casi di complicanze pulmonali (3) e la sua grande frequenza nelle urine (4) e nelle fecce (5); e poichè ancora oggi, come bene asserisce il Wesener (6), la diagnosi di tifo è di seria difficoltà, il medico prima di denunziare il caso in cura alla stazione sanitaria da cui dipende, avrà fatto scorrere tanto tempo che non è strano pensare che l'isolamento e le disinfezioni arriveranno se non come i famosi carabinieri di Offembach, certo quando il germe della malattia avrà avuto largo campo di irradiarsi dall'ammalato ai sani circostanti. E poichè su questi nessuna misura precauzionale di profilassi viene esercitata, è bene possibile il caso che essi come hanno ricevuta la malattia, nella stessa maniera vengano ad altri ancora a trasmetterla. Non solo, ma è anche da ammettere che date le diverse cause che influiscono sulla entità di sviluppo di ogni singola infezione, in qualcuno dei contagiati essa non pigli una forma grave, ma si mantenga nei limiti di una forma lieve, afebrile; allora il medico non sarà neanche chiamato, l'ammalato si cura da sè, o non si cura affatto dei suoi lievi e transitori disturbi, si guarisce, ma ciò non toglie che data la presenza dei bacilli del tifo nelle sue fecce (7) egli possa per ciò stesso servire come un mezzo di diffusione della malattia tanto più temibile per quanto meno è sospettato.

Un'altra e non meno lieve difficoltà della pratica applicazione del *sistema di Koch* va riscontrata nel pericolo che i guariti rappresentano per i sani, pericolo costituito dal fatto che il germe specifico si mantiene nelle urine e nelle deiezioni alvine per un periodo di tempo che nell'11 % tocca le 8-10 settimane e che nel 4.7 % dei casi giunge fino a più di tre mesi dalla guarigione; in un caso osservato dal Dönitz (8) il bacillo del tifo fu trovato nelle urine anche dopo 9 mesi, e alla stazione di Saarbrücken lo stesso Drigalsky ha avuto campo in un caso di isolare dopo lo stesso periodo di tempo dalle fecce di un tifoso guarito il bacillo di Eberth. Ora, il Drigalsky, tenendo conto di queste osservazioni, dice che non bisogna licenziare il tifoso dall'ospedale, e quindi non è lecito far cessare l'isolamento, sino a quando il ripetuto esame delle fecce e delle urine dei guariti non dia sicuro affidamento dell'assenza in esse del bacillo del tifo, cioè, come corollario, bisogna mantenere isolato il malato guarito e tuttavia

---

(1) Sem. médic., 1892, n. 4.
(2) Centr. f. Bakteriol., vol. XXV, p. 575, 1899.
(3) Lucatello. Berlin. klin. Wochens., 1894, n. 16.
(4) Petruschky. Cent. f. Bakter., 1898, vol. XXIII, p. 577. — Stefanelli e Cumbo. Rivista crit. di clinica medica, a. 1904, n. 11-13. — Hebert. Munch. med. Wochens, 1904, ecc.
(5) Pfeiffer. Deut. med. Woch., 1885, p. 500. — Drigalsky. Cent. f. Bakter., 1904, vol, XXXV, p. 792.
(6) Münchner med. Wochens., 1904, n. 23.
(7) Vilchour. The Lancet, 1886, 2, 17 luglio.
(8) Citato da Drigalski, l. c.

pericoloso per un periodo di tempo che le osservazioni eseguite dicono variante da 5 a 9 mesi; e possiamo noi credere sul serio che — a parte la maggior spesa da affrontare — si trovino sempre dei malati così pazienti che, guariti, rinuncino di ritornare alle loro famiglie, ai propri affari per starsene ancora, non dico altro, a godere per 2-3 mesi le delizie di una larvata prigionia?

Un'altra deficienza del sistema è poi ancora da mettere in rilievo, e propriamente la assoluta mancanza di misure profilattiche speciali per il personale di cura addetto agli ospedali di isolamento, per i disinfettatori, per tutto quello insieme di persone che deve per necessità avere continuati e intimi contatti con i tifosi isolati e che più direttamente affronta il pericolo della infezione. Non vigono per loro che le stesse norme, e non hanno essi a loro disposizione altri mezzi di difesa che quelli generalmento in uso in ogni ospedale che si rispetta e che tuttavia i dati statistici dimostrano inefficaci. E' a nostra conoscenza di fatti che per quanto queste infezioni ospedaliere si siano qualche volta circoscritte entro limiti non estesi (ad Amburgo Curschmann (1) da un lato e Rumpf (2) dall'altro fra migliaia di tifosi fanno ascendere solo a 0.57 % e rispettivamente a 0.85 % il numero dei casi dovuti a infezione in ospedale), nella maggior parte delle cliniche invece la percentuale si eleva a cifre non trascurabili. Così Liebermeister (3) a Basilea osservava che fra la totalità dei casi osservati il 2.4 % erano costituiti da infezioni ospedaliere: Schilder (4) in una statistica di 16 anni e mezzo eseguita sul materiale degli ospedali militari tedeschi e che comprende 23,554 casi, fa salire questa cifra a 4.3 %; Goth (5) a Kiel eleva ancora questa percentuale e la porta a 5.5 %; e Kirchner (6) in uno spazio di tempo che va dal 1881 al 1889 nota nell'esercito tedesco 987 casi di tifosi che contrassero la malattia negli ospedali, e appartenenti tutti al personale di cura degli ospedali stessi, numero che rappresenta nientemeno che il 6.3 % di tutti i malati di tifo osservati in tale periodo di tempo.

Così adunque indirizzata la lotta, per quanto essa possa dirsi teoricamente precisa, praticamente non può ancora rappresentare quello che si dice un organismo perfetto; ostacola senza dubbio il dilagare della epidemia in quanto che ne diminuisce le cause di diffusione, ma il nemico respinto da un lato penetra da un altro poichè le apprestate difese sono di sicuro incomplete e manchevoli.

E questa manchevolezza che pure può essere messa in rilievo guardando anche solo ad uno dei mezzi di diffusione della malattia, alla

(1) Vedi SCHUTZ. *Beitr. z. Statistik d. Typhus ab.* Jahrb. d. Hamburger Staats-Krankenhaeuser, 1889.
(2) Volkmans Sam. klin. Vortr., n. 109-110.
(3) In ZIEMSSEN. *Trattato di patol. spec. medica e terapia.*
(4) Zeits. f. Hyg., vol. 38, 1901, pag. 343.
(5) Arch. f. Klin. Medic., vol. 39, 1886, pag. 140.
(6) V. WEIL. Handb. d. Hygiene, vol. IX, pag. 435.

diffusione per contatto diretto, si rende ancora più manifesta e di maggiore importanza tutte le volte che si guarda alle molteplici vie, che non sempre è possibile mettere facilmente in evidenza, per le quali si propaga l'infezione eberthiana nell'uomo.

Io non pretendo — almeno per ora — di ritornare alla teoria di Pettenkoffer, tralascio anche di riassumere le esperienze che ho fatte eseguire dal Defranceschi (1) a Napoli e da cui risulta dimostrata la favorevole influenza di un suolo umido e ricco di sostanze organiche sulla esagerazione della virulenza del b. del tifo; ma non posso esimermi dal ricordare come il bacillo del tifo sia stato sperimentalmente capace di mantenersi nel suolo vivo e virulento per parecchi mesi (2) e magari per qualche anno (3), e che vivo e virulento lo hanno trovato nelle polveri stradali Uptadel, Kelsch, Salomonsen, Faelli, ecc. Santori (4) studiando la distribuzione dei casi di tifo nell'abitato di Roma si trova costretto a dare grande importanza a queste polveri come fattore essenziale di trasmissione della malattia; lo stesso avevano già notato Trydo e Salomonsen (5) nella epidemia di tifo che nel 1885 infierì nella caserma di marina a Copenaghen, lo stesso avevano osservato Pfuhl (6) e poi Virchow (7) e per tacere di altri splendidamente dimostrativo è a questo riguardo il caso della epidemia di tifo avveratasi nella caserma Forgemol in Tunisia e descritta da Remlinger e Sanglé-Ferrière (8), epidemia esclusivamente dovuta alla polvere specificamente infetta che il vento portava in certi quartieri della caserma da un campo distante circa un chilometro e concimato con cessino.

E' ancora notorio quanta importanza vada assegnata all'acqua nella diffusione di questa malattia e per cui anche senza accettare l'opinione di Brouardel che nel VI congresso d'igiene a Parigi diceva che il 90 % delle epidemie di tifo sono dovute all'acqua potabile, anche ritenendo come discutibili i risultati statistici dello Schüder (l. c.) il quale su più di 600 epidemie studiate fra il 1870 e il 1899 ne attribuisce all'acqua contaminata il 77.4 %, non possiamo negare tuttavia i numerosi casi in cui si è potuto batteriologicamente dimostrare non solo la presenza del bacillo del tifo nelle acque potabili, ma la stretta dipendenza di causa ed effetto fra questa presenza e lo sviluppo dell'epidemia corrispondente. Così Konradi (9) menziona le osservazioni fatte da Lösener a Berlino, quelle di Kubler e Neufeld (1898), di Hankin (1899), di Genersich a Pécs in Ungheria, di Hanriot a Parigi (1900), di Fischer e Flatau (1901), di Tavel e quella da lui stesso fatta a Nagyszeben in Ungheria nel 1902. Ad Amburgo nel 1892-93 avvenuto un inquinamento contemporaneo delle acque di condotta

---

(1) Revue d'Hygiène, 1904, n. 5.
(2) Grancher e Deschamps. Arch. d. Méd. expèr., 1889.
(3) Rullmann. Centr. f. Bakter., vol. XXX, 1901, pag. 321.
(4) Il Policlinico, Sez. pratica, 1903, n. 57-58.
(5) Citato da Gasser. *Le cause della febbre tifoidea*, p. 126. Torino, 1893.
(6) Zeits. f. Hyg., vol. XIV.
(7) Berlin. klin. Wochensch., 1893, n. 7.
(8) Revue d'Hygiène, 1898.
(9) Centr. f. Bakter., vol. XXXV, 1904, p. 568.

con germi del tifo e del colera si vide pochi giorni dopo scoppiare il colera in città, e — concordemente a quello che sappiamo sul periodo di incubazione del morbo — due a tre settimane appresso scoppiare il tifo (1). Pfeiffer (2) nella epidemia di tifo a Zehdenik constata che di 303 persone che si servirono dell'acqua di un pozzo inquinata con le deiezioni di due bambini tifosi, 94 ammalarono di tifo; Barth (3) in condizioni analoghe potè perfino rendersi esatto conto della durata effettiva del periodo di incubazione della malattia. Altra osservazione del genere sarebbe quella di Pfeiffer a proposito della epidemia di tifo avvenuta a Lünenburg (4), e poichè si parla di influenza dell'acqua nella diffusione della malattia è bene ricordare come anche i bagni fatti in acque specificamente infette servano bene allo scopo (5) e bene ugualmente agiscono il ghiaccio (6) e le acque minerali (7).

Aggiungiamo poi a questi mezzi di diffusione della malattia il latte inquinato, a cui Schüder (l. c:) attribuisce 110 epidemie di fronte a 462 cagionate dall'acqua, epidemie, poi, di cui gli esempi abbondano nella letteratura inglese (8); e col latte bisogna tener conto anche del burro per il quale Bruck (9), lavorando nel laboratorio di Koch, ha potuto dimostrare che la sua preparazione in recipienti sciacquati con acqua inquinata fa in esso, a preparazione eseguita, constatare la presenza del bacillo di Eberth che vi si mantiene attivo per circa 27 giorni e che in principio è anche capace di moltiplicarvisi.

Alle ostriche Schüder attribuisce il 3.5 % delle epidemie, fra cui è bene citare quella di Pola descritta da Horeicka (10).

Le verdure, non perchè attraverso le loro radici sane o maltrattate possa passare il germe specifico, ma solo perchè imbrattate di escrementi infetti adoperati per la loro concimazione (11), possono anche esse servire a diffondere la malattia; e sono ancora a questo stesso proposito, per come sostiene Celli, da tenere nel dovuto riguardo le mosche, per le quali Ficker (12) ha sperimentalmente dimostrato la possibilità che il bacillo del tifo si mantenga vivo nel loro intestino e possa venire emesso con gli escrementi per un periodo di 25 giorni circa da quello dell'avvenuta ingestione di materiale infetto, ed alle quali Alice Hamilton (13) attribuisce gran parte della recente epidemia di tifo verificatasi a Chicago.

---

(1) Reineke. Deut. Vierteljah. f. öffent. Gesundheitspflege, vol. XXXVIII. 1896, fasc. 3°.
(2) Klin. Iahrb., vol VII, p. 195.
(3) Zeit. f. klin. Medic., vol. XLI, 1900.
(4) Klin. Jahrb., vol. 7, p. 159, a. 1900.
(5) Pfuhl. Deut. militärärzt Zeits, 1888, p. 385.
(6) Park. Virchow-Hirsch's Jahresber, 1901, vol. II, p. 16.
(7) Helwig. *Die Typhusepidemie in Mainz im Sommer* 1884. Magonza, 1885.
(8) V. Tripe. British med. Jour., 4 gennaio 1879; Hart. British med. Jour., luglio-agosto 1885, ecc.
(9) Wien. klin. Wochenschrift, 1903, n. 38.
(10) Wien. medic. Wochenschau, 1900, n. 2.
(11) Claudiz. Hyg. Rundschau, vol. XIV, 1904, p. 865.
(12) Arch. f. Hyg., 1903, fol. 3°.
(13) Med. News, 7 marzo 1903.

Ora, data la molteplicità delle vie per cui mezzo può diffondersi l'infezione, anche senza negare — e non lo si potrebbe, invero — l'importanza essenziale dell'uomo infetto al riguardo, pur tenendo presenti i numerosi casi in cui la diffusione per contatto e per via idrica si influenzano e si completano a vicenda (dimostrativo è l'esempio della epidemia di Thalexweiler di cui parla Drigalsky nel suo citato lavoro) non è tuttavia da misconoscere come possano non raramente dimostrarsi incomplete alla prova pratica le misure sanitarie adottate col « sistema Koch ». L'isolamento e le disinfezioni nei casi di tifo riconosciuti come tali, certo diminuirà le probabilità di infezione per gli abitanti di una determinata località, ma non si verrà affatto in tal modo ad eliminare la causa prima della infezione medesima, quella che ha determinato la malattia nel primo caso verificatosi e poi isolato, causa che permane e continua ad esplicare la sua azione sui sani rimanenti ad essa esposti, e che può essere rappresentata dall'acqua di un pozzo, da una partita di burro, da uno stock di ostriche coltivate in un bacino infetto è così via dicendo. L'inchiesta sanitaria che il tecnico esegue per stabilire la causa prima della epidemia e provvedere in conseguenza, porterà magari ad una conclusione positiva che permetterà di riconoscere la fonte del pericolo e quindi di sopprimerla. Ma quanto tempo sarà durato questo periodo di indagini, di studi non lievi, non facili, non brevi prima che a questo fine desiderato si sia potuto arrivare? E nel frattempo, poichè la causa morbigena continua ad agire, è lecito lasciare contro di essa indifesa tutta una popolazione aspettando il momento in cui su basi sperimentali si sarà in grado, riconosciuta questa causa, di eliminarla? La risposta a tale quesito non può essere che una sola, e negativa. E poichè senza speciali impianti, senza limitare ad una malattia sola il compito assegnato ai sanitari proposti alla tutela della pubblica salute, con l'andare in vigore della nuova legge sugli ufficiali sanitari (legge 25 febbraio 1904) noi avremo in Italia una quantità di vere, per quanto più o meno grandi stazioni sanitarie sparse per tutta la nazione, all'ufficiale sanitario il quale dietro denuncia di un caso di tifo avrà preso tutti quei provvedimenti che la sua scienza gli suggerisce e che le nostre leggi sanitarie gli consentono onde arrestare il diffondersi del morbo, un mezzo bisogna mettere sotto mano, quello cioè di potere integrare queste misure di profilassi generale delle malattie infettive, con misure e con metodi di profilassi specifica, conferendo l'immunità contro la malattia al maggior numero possibile di persone e specie a quelle che con l'ammalato hanno, o hanno avuto più frequenti cause di contatto, e sopperendo in tal modo con più efficacia, prontezza e sicurezza a tutte quelle limitazioni della libertà personale (periodo di

osservazioni, quarantene, ecc.) che dovrebbero far parte integrante del *sistema di Koch* qualora lo si volesse rendere praticamente preciso.

Le due serie di misure, non si escludono, ma si completano a vicenda; e lungi dal rinnovare per il tifo quel pernicioso esclusivismo per cui si è voluto per la peste ridurne da un lato la profilassi alle sole vaccinazioni (Haffkine), e dall'altro alle sole misure igienico-sanitarie (Gottschilich), io riconosco che le disposizioni del « sistema di Koch » le quali, come ho detto, non contengono di nuovo che una rinnovata energia delle misure di profilassi generale delle malattie infettive comunemente adottate, possono mirabilmente giovare a diminuire le cause mediate o immediate di infezione, ma le pratiche difficoltà della loro integrale applicazione inducono nella linea di difesa dei vuoti, delle falle non trascurabili che solo le vaccinazioni specifiche, su larga scala eseguite, sono al caso di colmare.

In Germania le 5 stazioni sanitarie impiantate hanno dato così buoni risultati, che già si progettava nello scorso anno lo impianto di altre stazioni sanitarie del genere in altre parti dell'impero; da noi, senza tanti sfoggi di mezzi, si è anche arrivati, con queste misure di profilassi generale, a ridurre come ho detto della metà la mortalità per tifo; ma fino a tanto che vi sarà tifo endemico le epidemie sono sempre da temersi, e fino a quando non avremo, come a Londra per il vaiuolo, fatto scomparire o resa rara la malattia, non si potrà dire di aver raggiunto quello scopo, che solo una bene intesa e una bene eseguita immunizzazione in massa può metterci in grado di raggiungere.

Se poi questo va detto per le popolazioni delle città, dove le misure di igiene e di polizia sanitaria hanno campo più o meno vasto di poter essere convenientemente applicate, devesi per necessità ricorrere alla profilassi specifica, alla immunizzazione artificiale nei casi in cui bisognerà provvedere alla salute delle popolazioni rurali, o peggio ancora a quella di forti masse di truppe in campo, o di truppe coloniali.

Il tifo è il gran nemico degli eserciti, e forse le più disastrose battaglie sono in tali circostanze quelle che si combattono negli ospedali. Citerò a ragione di esempio, che mentre anche nei paesi più maltrattati dal tifo la mortalità per questa malattia non raggiunge che il 6-7 ‰, dice invece il Weichselbaum (1) che nella guerra di secessione americana si ebbero 57,368 casi di tifo con 8789 morti, ciò che porta rispettivamente ad una morbilità del 93.1 ‰ e ad una mortalità di 11.1 ‰ della forza totale; e dice il Kirchner che durante la guerra franco-prussiana il 60 % dei casi di morte era causato dal tifo.

---

(1) In WEIL. Handb. d. Hyg., vol. IX, p. 432.

In questi casi la necessità della immunizzazione in massa non ha bisogno di essere dimostrata, in quanto che, data la molto limitata applicazione possibile delle buone norme dell'igiene e della profilassi generale delle malattie infettive, a ostacolare il dilagare della malattia un solo mezzo c'è che possa dare ed ha dato — teoria a parte — anche praticamente quella garanzia che si desidera, ed è la vaccinazione; e se nel primo caso — in cui per essere possibile che effettivamente le regole igieniche vengano nella loro interezza applicate e che si trovino persone che intendendone l'importanza ad esse volentieri si sottopongono — le vaccinazioni possono anche ritenersi solo come un utile sussidio, nel secondo invece, in cui la necessità o l'ignoranza rendono l'igiene un mito, le vaccinazioni si impongono come il mezzo più essenziale di lotta contro la malattia.

Stando quindi in quest'ordine di idee, dopo aver riguardato agli effetti fin'ora ottenuti con le vaccinazioni antitifose nell'uomo, mi sono accinto ad uno studio che potrei chiamare una rivista sperimentale, tendente a constatare di persona l'efficacia dei vari mezzi e prodotti immunizzanti specifici preconizzati dai diversi autori, e vedere quindi quale fra essi si possa dire più attivo e conveniente per essere non come vaccino usato nell'uomo, ma per venire ulteriormente sull'uomo stesso sperimentato.

IMMUNIZZAZIONE ARTIFICIALE NELL'UOMO.

Su questo riguardo tutti i dati che noi possediamo si riferiscono alla immunità attiva artificialmente conferita, di cui le prime osservazioni rimontano a Pfeiffer e Kolle (1) in quanto che le precedenti osservazioni di Fraenkel (2), più che la vaccinazione a scopo profilattico, hanno di mira di raggiungere effetti curativi della infezione tifica in atto nell'uomo a mezzo di un processo di immunizzazione attiva.

I due citati autori seguivano in ciò fare le orme segnate dall'Haffkine in India, alle cui 100,000 vaccinazioni anticoleriche davano la sanzione scientifica e sperimentale gli studi del Kolle (3). E' da notare che l'Haffkine ad una prima iniezione di culture uccise ($^1/_{12}$ di cultura su agar) faceva seguire a cinque giorni di distanza una iniezione di $^1/_6$ di cultura su agar viva, mentre che Ppeiffer e Kolle non fanno altro che, adoperando un

(1) Zeits. f. Hyg. u. Infectionskrank. Vol. XXI; e Deut. med. Wochens., 1896, n. 46.
(2) Deut. med. Woch., 1893, p. 985.
(3) Cent. f. Bakter. Orig. Vol. XIX, n. 405.

germe di virulenza nota (D. M. L. = $^1/_{10}$ di ansa = $^2/_{10}$ di mg.), stemperano un'ansa di cultura in 1 cmc. di acqua, e, previo scaldamento a 56°, ne iniettano $^1/_{10}$ di cmc. per ciascuno sotto la pelle del dorso a due uomini, i quali dopo poche ore hanno tumefazione e dolore al punto della inoculazione, cefalea, elevazione termica (38°.5), sonno irrequieto durante la notte. In capo a 48 ore i segni della avvenuta reazione scompariscono; i due autori non hanno constatato, come seguito della iniezione fatta, nè infiltrazioni nè ascessi. Hanno potuto invece vedere, che il siero di questi due individui, undici giorni dopo la avvenuta iniezione, agglutinava in diluizione di 1 : 50, 1 : 500, 1 : 1000, e, saggiato sulle cavie dal punto di vista del suo potere battericida (Mischungmethode - Pfeiffer), si è mostrato attivo in una quantità limite rispettivamente di cmc. 0.075 e 0.01, raggiungendo con ciò quei limiti di attività che si possono constatare, e che non sono oltrepassati dal siero dei convalescenti di tifo, presso i quali si è tutti d'accordo nello ammettere uno stato immune naturalmente acquisito contro la infezione.

Basandosi su queste osservazioni, Pfeiffer e Kolle affermano il concetto che si può col loro metodo ottenere una solida immunità nell'uomo e ne preconizzano l'impiego per le armate in campo, sovente decimate dalla infezione, e per il personale di cura degli ospedali.

Sette anni appresso Bassenge e Rimpau (1) riprendevano le esperienze di Pfeiffer e Kolle, e, dopo avere osservato quello che già Pfeiffer e Marx (2) avevano visto, e cioè che la iniezione di culture morte di bacilli del tifo dà luogo nei malarici a forti elevazioni di temperatura, affermano che ottimi risultati di immunizzazione attiva si possono ottenere negli uomini col sistema delle vaccinazioni alla Pfeiffer, sistema che essi hanno modificato nel senso che invece di $^1/_{10}$ di ansa di tifocultura in una volta sola, essi usano iniettare ripetutamente e in dosi crescenti minori quantità di cultura.

Le loro osservazioni sono state fatte su otto uomini, e da esse gli autori credono di poter dedurre che: « a mezzo di iniezioni di $^1/_{20}$, $^1/_{15}$ e $^1/_5$ di ansa di tifo-cultura uccisa, si può conferire all'uomo una immunità, la quale, in vista del potere agglutinante e battericida raggiunto dal siero dei trattati, si mostra per lo meno uguale a quella che viene conferita dalla malattia stessa agli individui che la vincono »

In ogni modo, con l'uno e con l'altro metodo di vaccinazione sopra descritti, a parte gli effetti di immunizzazione di cui appresso parleremo, si va incontro ad un inconveniente non trascurabile, rappresentato dai sintomi di reazione locale e generale prolungantisi per due giorni o anche

---

(1) Festsch. f. siebenzig. Geburtstage v. R. Koch. Jena, 1903, p. 315.
(2) Deut. med. Wochens., 1898, n. 31.

più, disturbi che potrebbero, anzi dovrebbero essere evitati, e ridotti al minimo anche perchè dai risultati sperimentali dello stesso Bassenge appare come non ci sia alcun rapporto fra l'entità della reazione al vaccino e' l'acquisito potere agglutinante e battericida del siero.

Migliori effetti si avrebbero quindi, da questo lato considerando la cosa, col metodo dei « recettori liberi » di Shiga (1).

Questo autore in collaborazione col Neisser (2) potè dimostrare che se una patina di agar-cultura di bacillo del tifo — come anche di dissenterico — viene emulsionata in 10 cmc. di soluzione fisiologica di cloruro sodico, e dopo essere stata sottoposta per un'ora all'azione di una temperatura di 60° C. viene tenuta per due giorni a 37°, filtrando su filtro di porcellana (Reichelfilter) la emulsione, si ha un filtrato il quale iniettato per via endovenosa nei conigli, senza dar luogo ad alcun disturbo di sorta, eleva il potere agglutinante del sangue già dopo aver ripetuto per una seconda volta l'iniezione fino ad un titolo di 1 : 5000 e fino a 1 : 20,000 in seguito ad una terza iniezione. Per riguardo poi al potere battericida del siero dei conigli trattati, si osservava che se la sterilizzazione della cultura si faceva a 60°, si poteva avere dal coniglio un siero di cui 0.001 cmc. di siero inattivato addizionato di 0.2 cmc. di siero normale di coniglio, era capace di distruggere una quantità innumerevole di germi infra tre ore; se invece la sterilizzazione si faceva avvenire a 75°, il siero del coniglio trattato con tale filtrato acquistava un forte potere agglutinante, ma non mostrava che un potere battericida dieci volte minore dell'altro.

Tale constatazione, mentre induceva gli autori ad una conclusione teorica per la quale si affermava essere la sostanza agglutinogena termoresistente, e termolabile invece la sostanza lisogena, avviava lo Shiga a delle ricerche d'indole pratica tendenti a stabilire se a mezzo di queste iniezioni di recettori liberi fosse possibile ottenere nell'uomo gli stessi effetti che nel coniglio.

E nell'anno successivo pubblicava difatti le esperienze seguenti: — Una cultura su agar di 24 ore di tifo-bacillo viene emulsionata in cmc. 5 di acqua e trattata nel modo avanti descritto. Col filtrato di questa emulsione lo Shiga si fa una prima iniezione sottocute di cmc. 0.05: nessuna reazione.

Qualche giorno dopo si reinocula cmc. 0.25 di filtrato: ha rossore in sito, leggiera tumefazione dei gangli linfatici prossimiori, lieve ipertermia, fenomeni tutti scomparsi in 48 ore.

Lo stesso trattamento si espone a subire il dottor Lipstein, a cui si fa una prima iniezione di cmc. 0.10 e poi una seconda di cmc. 0.50 con scarsi sintomi di reazione intervenuti solo dopo questa seconda

(1) Berlin. med. Wochensc., 1904, n. 4.
(2) Deut. med. Woch., 1903, n. 4.

reazione e scomparsi in 48 ore. Due giorni appresso l'ultima iniezione, il siero di sangue di Shiga agglutinava in una diluizione di 1 : 640, quello di Lipstein in una diluzione di 1 : 80.

Io mi fermo a questo punto a esaminare questi risultati non solo, ma sopratutto le conseguenze che se ne vorrebbero dedurre, e cioè che visto che il potere agglutinante del siero di sangue degli uomini nei modi sopra descritti trattati, e il suo potere battericida, si portano fino a quei limiti che generalmente si vedono raggiunti dal siero di sangue di individui che hanno superato un attacco di tifo, poichè questi, come è generalmente ammesso, possono a buon diritto considerarsi come vaccinati, ugualmente vaccinate alla loro volta devono ritenersi quelle persone, che col procedimento di Pfeiffer o di Bassenge, o con quello di Shiga sono state trattate. Ora, a me non sembra che a favore di questa maniera di giudicare la cosa, depongano le osservazioni che noi possediamo in rapporto al valore del potere agglutinante e a quello del potere battericida come indice di un conseguito stato immune.

Cominciando, di fatti, col potere agglutinante del siero, egli è da osservare che — a parte ogni discussione teorica se esso sia un fenomeno di infezione o di immunità — sta il fatto che esso può essere assente in individui che hanno sofferto il tifo e che sono perciò immuni certamente verso la malattia; che esso si può riscontrare manifesto in casi in cui tanto poco l'immunità ha avuto campo di stabilirsi che gli individui che lo presentano, con una infezione in atto, vanno a morte; che può mancare in casi in cui il saggio di Castellani dimostra con la maggiore evidenza che nel caso in esame si tratta di una infezione eberthiana; che può aversi infine una siero-reazione positiva anche a forti diluizioni in casi di ittero, tubercolosi, infezioni diplococciche, streptococciche, ecc., in cui è di sicuro accertata l'assenza di ogni complicanza tifosa, e l'inesistenza di una infezione tifica preceduta. In quanto alla prima obbiezione si potrebbe dire che la mancanza della siero-reazione, in individui dotati di una sicura immunità naturalmente acquisita, dipenda dal tempo in cui la siero-reazione stessa è stata eseguita, in quanto che dagli studi di Köhler (1), come anche da quelli di Pfeiffer e Kolle (2), risulta spesso che presso i bambini tre mesi dopo l'inizio della malattia, e presso gli adulti un po' più tardi, scomparisce dal sangue l'agglutinina specifica e con essa anche le batteriolisine, mentre per anni ed anni, e forse anche per tutta la vita, permane l'immunità acquisita dopo aver superato la malattia. Lo stesso potrebbe anche dirsi per il caso della siero-reazione negativa nei casi in cui riesce positivo per il tifo l'esame del sangue e per i quali la ricerca dell'agglutinina, proseguita anche dopo la caduta della febbre, avrebbe forse potuto portare il ricercatore a scoprirla. In quanto al notato fatto dello esagerarsi del

(1) Klin. Jahrbuch., 1901. Vol. VIII, fas. 1º.
(2) Zeitsch. f. Hyg., 1896. Vol. XXI.

potere agglutinante del sangue nel periodo preagonico, ammettiamo pure con Iversen (1) che la comparsa di questa proprietà del siero sia un fenomeno prodromico della immunità e che il notato fenomeno sia da considerarsi come uno sforzo supremo, riuscito vano, dell'organismo che cerca di sopravanzare l'infezione invadente. Ma fra tutte non si può pel mio assunto negar valore all'ultima delle obbiezioni fatte, in quanto per essa risulta che vi sono malattie, che nulla hanno da fare col tifo, e che pure danno luogo a delle agglutinine specifiche. Il fatto certo non è costante nè frequente, in quanto che rappresenta appena il 4-6 % della totalità delle osservazioni, ciò che induce Iversen (l. c.), quantunque Grünberg e Rolly, in vista della agglutinazione di gruppo coi paratifi, negano a questa reazione ogni carattere di specificità (2), a dire che l'agglutinamento è un fenomeno specifico ma non patognomonico; ma il fatto esiste, e in ogni caso dimostra in linea generale che noi non possiamo parlare di immunità antitifica acquisita solo per essere riusciti con un procedimento qualunque a conferire al siero di sangue dell'uomo potere agglutinante per il b. del tifo, giacchè vi sono dei casi in cui, pur essendo indiscutibile l'assenza di uno stato immune specifico, viceversa è evidentemente dimostrabile la proprietà agglutinante del siero. A questi casi, poi, direttamente verificati nell'uomo, un gran numero se ne aggiungono nel campo sperimentale. Così abbiamo che Malvoz (3), Memmo e Altobelli (4), Köhler (5), dimostrano come abbiano potere agglutinante delle sostanze chimiche svariate di origine animale e vegetale; Shiga nel suo ricordato lavoro, eseguito in collaborazione col Neisser, dimostra come si possa a mezzo dei suoi « recettori liberi » scaldati a 75° conferire al siero di sangue dei conigli quasi esclusivamente potere agglutinante; Brieger (6), e subito dopo Schutz (7), mediante uno speciale procedimento chimico isolano dalle culture di tifo una sostanza esclusivamente dotata di potere agglutinogeno; io stesso (8) ho potuto notare, or sono diversi anni, che la nucleo-albumina che si ottiene dal filtrato alla candela di brodo-culture di tifo è dotata di proprietà agglutinogene, ma manca di ogni potere immunizzante; e Fraenkel e Otto (9) notano — fatto più tardi confermato dal Castellani (10) — che il siero di sangue di un cane, al quale si sono fatte ingerire delle culture di tifo, mostra di possedere evidenti proprietà agglutinogene, ma è assolutamente sprovvisto di specifico potere battericida.

Ne risulta quindi tanto da quello che nell'uomo è dato osservare, quanto — e sopratutto — per gli insegnamenti che a noi danno i

---

(1) Zeitsch. f. Hyg., 1905. Vol. 49, fas. 1°.
(2) Münch. medic. Wochens., 1905, n. 3.
(3) An. de l'Ins. Pasteur, 1897, p. 582.
(4) Citato da Iversen (l. c.).
(5) Centr. f. Bakter. (Orig.), 1901, pag. 683.
(6) Deut. med. Wochens., 1902, p. 477.
(7) Ibid., p. 479.
(8) Gazzetta intern. di Medicina pratica, 1903, n. 10.
(9) Münch. medic. Wochens, 1897, n 3.
(10) Zeits. f. Hygiene. Vol. 37°, a. 1901, p. 381.

risultati delle ricerche sperimentali che i due fatti, potere agglutinante e immunità acquisita, sono così dissociati, così indipendenti l'uno dall'altro, che male si apporrebbe chi volesse dalla presenza dell'uno inferire la esistenza dell'altro, o peggio ancora dedurre, come per cose legate in diretto rapporto di causa ed effetto, dalla rilevata entità dell'uno, la eventuale entità dell'altro fatto.

Nè meno soggetto a critica è l'altro lato della quistione, quello cioè per cui è parso di poter dire immune quell'individuo che sottoposto ad un determinato trattamento preventivo mostra alla fine di esso di possedere un siero di sangue dotato di cospicuo potere battericida.

Potrei a questo proposito ricordare i lavori di Metchnikoff (1) sul coccobacillo di Gentilly, quelli di Karlinsky (2) che riguardano la proprietà del siero degli animali vaccinati contro l'hog-cholera e il coccobacillo della *swine-plague*, quelli di Laveran e Mesnil (3) sul siero degli animali vaccinati contro la tripanosomiasi dei ratti, ed altri casi ancora, da cui chiaramente appare come possa esistere uno stato di solida immunità senza che il siero di sangue spieghi azione di sorta nè agglutinante, nè microbicida sui germi rispettivi. Ma io non voglio entrare in una discussione che potrebbe parere una digressione, e che portandomi nel campo della scienza pura potesse farmi derogare dallo scopo puramente pratico che io voglio assegnare a questo lavoro. Limitandomi quindi a ciò che nel tifo è dato osservare, devo tuttavia ricordare quello che ho detto risultare dai lavori già citati di Köhler e di Pfeiffer e Kolle, e cioè che, mentre perdura per diecine di anni, e magari per tutta la vita, lo stato immune negli uomini che hanno subìto la malattia, ben presto invece perde il loro siero di sangue col potere agglutinante specifico, ogni specifica azione battericida; quello che vi ha di notevole in tali circostanze non è la presenza dimostrabile di tali proprietà del siero, quanto la capacità naturalmente o artificialmente acquisite dagli elementi cellulari dell'organismo di reagire allo stimolo specifico con una attività che fa difetto agli elementi cellulari di un organismo nuovo, induzione questa a cui ci portano e l'osservazione di Shiga che, attaccato 12 anni prima da una infezione di tifo, vedeva il suo siero diventare più agglutinante e più battericida di quello del Lipstein, che il tifo mai aveva sofferto, e che pure aveva ricevuto in due iniezioni una quantità di « recettori liberi » doppia di quella ricevuta dallo Shiga stesso; come ancora i lavori di von Dungern (4) e di Cole (5), dei quali due autori il primo, nelle sue ricerche sulle siero-precipitine, vedeva che gli animali già trattati, anche quando ogni azione precipitante specifica era scomparsa

(1) An. de l'Ins. Pasteur, 1892. Vol. VI, p. 289.
(2) Zeits. f. Hyg., 1898. Vol. XXVIII, p. 406.
(3) An. de l'Ins. Pasteur. Settembre 1901.
(4) *Die Antikœrper*. Jena, 1902; e Centralb. f. Bakter. Orig., 1903. Vol. XXXIV, f. 4°.
(5) Zeits. f. Hygiene, 1904. Vol. XLVI, f. 3°.

dal loro siero, dopo una nuova iniezione mostravano una comparsa di siero-precipitine in quantità maggiore di quello che non gli animali nuovi; ed il secondo, dietro la scorta di questi risultati, osservava che, se a conigli sopravvissuti ad una infezione di tifo e ad altri nuovi si inietta la stessa dose di tifo-cultura, i primi danno un siero in cui la quantità degli anticorpi è molto maggiore che non nei secondi.

Se però non è lecito dalla mancanza di un dimostrabile elevato potere battericida del siero di sangue dedurre la assenza dello stato immune specifico, specie allorchè questo data da un certo non breve periodo di tempo, se in altri termini l'esito negativo della prova non ci mette in grado di affermare o di negare che la vaccinazione ha conseguito il suo effetto immunizzante, dovrebbe invece condurci ad una dichiarazione affermativa il caso in cui la ricerca del potere battericida del siero riesce positiva? Così la pensano Pfeiffer e Kolle, Bassenge e Rimpau, Shiga, ai quali pare che il problema delle vaccinazioni anti-tifose sia stato risolto per il fatto che a mezzo dei loro rispettivi metodi di immunizzazione hanno visto elevarsi nell'uomo il potere battericida del siero di sangue. Ora egli è certo che l'elevato titolo a cui questi autori hanno visto spiegare al siero dei loro uomini trattati azione batteriolitica dà la presunzione della presenza della sensibilizzatrice, indice comunemente ritenuto vero dello specifico stato immune; ne manca però, in ogni caso, l'apodittica dimostrazione, e noi ci troviamo di fronte a un fatto, che non decomposto nei suoi fattori, potrebbe magari indurci ad un errore di giudizio — come dirò a proposito del vaccino Besredka — in quanto che esposto in tal modo noi non abbiamo dati sperimentali sufficienti per dire se e quanta parte nelle osservazioni fatte da Pfeiffer e Kolle, da Bassenge, ecc., spetti rispettivamente alla sensibilizzatrice e alla citasi del siero, l'aumento della quale ultima noi siamo in grado di ottenere senza bisogno di un trattamento specifico e senza perciò conferire una specifica immunità. La ricerca del potere battericida del siero, in questi casi, senza la dimostrazione della influenza della sensibilizzatrice nel fenomeno può portare ad un falso apprezzamento di esso, e si vedrà a proposito delle esperienze eseguite col vaccino di Wright, come una cavia immune avesse un siero che, sperimentato così come veniva dall'animale, mostrava un potere battericida debole ed inferiore a quello di un'altra cavia, che per avere ricevuto una forte dose di vaccino, doveva ritenersi come non immunizzata. E' questo adunque un indice assai fallace per potere essere attendibile, e fallace ugualmente forse è anche da ritenersi lo stesso esame del potere battericida, mettendo in rilievo tutta la efficacia della stessa sensibilizzatrice qualora si moltiplicassero le osservazioni fatte da Korte e Steinberg (1), i quali, seguendo un metodo di cui appresso ci occuperemo, e col quale il potere battericida del siero è veramente in funzione della quantità della sua sostanza intermediaria, hanno osservato due casi di recidiva in individui in cui il titolo del potere battericida per il bacillo del tifo si elevava ad un limite di 1 : 100,000 e di 1 : 4,000,000.

Inoltre, io ho alcune esperienze — poche in verità — da cui parrebbe che un indice del conseguito stato immune possa ritenersi la efficacia pre-

---

(1) Deut. Arch. f. Klin. Med. Vol. LXXXII, p. 321-339.

ventiva del siero degli animali in esame; ma Metchnikoff (1) sostiene che tale proprietà del siero di sangue non può essere assunta come misura della immunità; e allora piuttosto che contentarci delle prove che a suffragio della tecnica da loro impiegata portano gli autori sopra citati, cui spetta il merito di questi tentativi — del resto tutt'altro che sterili — di immunizzazione attiva dell'uomo. in un argomento tanto delicato e di così grande importanza per la tutela della pubblica salute, il giudizio effettivo, finale non può essere dato che da una prova diretta eseguita sull'uomo o correndo il rischio che Marx (2) ha fatto correre ad un inserviente di laboratorio, che dopo un certo tempo decorso dal momento in cui fu iniettato il vaccino, venne inoculato con coltura pura di tifo-bacillo, oppure — poichè questa usanza di assumere l'uomo a rischio della vita, come animale da esperienza, per fortuna, non è ancora tanto diffusa — praticando col vaccino in esperimento delle vaccinazioni su larga scala, per trarre poi dai dati statistici relativi quelle conseguenze che solo possono dare un serio affidamento sulla bontà o meno del vaccino impiegato.

Ora, da questo punto di vista riguardando il problema, non vi è che un unico vaccino, il solo del resto che ci rimanga ad esaminare, ed è quello di Wright e Semple (3). Questi due autori, un anno dopo che Pfeiffer e Kolle avevano pubblicato il loro avanti ricordato lavoro sulla immunizzazione attiva dell'uomo contro il tifo, facevano noti i risultati avuti con un vaccino da essi preparato.

Il vaccino veniva allestito coltivando in brodo a 37° il bacillo del tifo per 2-3 settimane in grandi matracci, in cui, assieme al brodo, si introduceva una certa quantità di grasso che, spalmandosi sul liquido di cultura sottostante, lo isolava dall'aria. Trascorso il voluto tempo di incubazione, le culture venivano sterilizzate a 60° a bagnomaria, se ne saggiava quindi la sterilità a mezzo di pròve culturali, e quindi — a scopo di conservazione — al vaccino così preparàto si addizzionava 0. 5 % di acido fenico, impiegando quindi per iniezione sottocutanea nell'uomo la stessa dose di vaccino che riusciva mortale per 100 gm. di cavia (0. 5-1. 5 cmc.) e che, secondo gli autori, sta in rapporto al numero dei batteri contenuto in ogni cmc. di liquido, numero che essi constatavano a mezzo di un complicato procedimento. Trascorsi 8-14 giorni si rinnovava nell'uomo la iniezione di una nuova dose di vaccino.

Il vaccino è stato impiegato in India, in Egitto, a Cipro, e nel Sud-Africa fra le truppe inglesi, fra le quali, come nota Smith (4), su 1000 soldati si avevano annualmente 36 tifosi, di cui 10 morivano. In quanto ai

(1) *L'Immunité dans les mal. infect.* Parigi, 1901, p. 285.
(2) *Die exp. Dyag. Serumther. u. Prophyl. der Infektionskrankheiten.* (Cap. *Tifo*). Berlino, 1902.
(3) Brit. med. Jour., 1897, 30 genn.
(4) Jour. of. tropical med., 1° sett. 1904.

risultati che da esso è lecito sperare non è mancato chi al vaccino di Wright ha negato ogni azione di sorta. Elliot e Washburn (1) da un lato, Melville (2) dall'altro dicono che il vaccino non ha spiegato influenza di sorta nè sul numero dei malati nè sul decorso della malattia, e Pearson (3) dice che le vaccinazioni antitifiche nel Sud-Africa hanno dato risultati così disparati che nessuna conseguenza è possibile dedurre da essi. Quello però che il Wright ha pubblicato dal 1897 in poi, e i dati statistici che egli ci offre stanno in perfetta contraddizione con le dubbiezze e le denegazioni degli autori precedenti. Nel 1898-99 difatti questo sperimentatore riferiva di aver trattati col suo vaccino 2835 soldati, lasciandone 8460 non vaccinati, e constatava, che mentre fra questi ultimi si ebbe una mortalità di 0.34 % ed una morbilità di 2.5 %, fra i primi invece la mortalità scese a 0.2 % e la morbilità a 0.95 %. Il vaccino venne ancora provato fra le truppe anglo-indiane durante la guerra del Transvaal, e fu osservato che fra 2139 vaccinati si ebbero 39 malati di tifo e 10 morti, con una morbilità cioè di 1.35 % e una mortalità di 0.46 %, mentre fra 10,520 non vaccinati si ebbero 1504 malati di tifo (14.29 %) e 336 morti (3.19 %); risultati questi che tanto più depongono a favore dell'efficacia del vaccino di Wright, in quanto che per essere stati vaccinati e non vaccinati, specie nell'assedio di Ladysmith, esposti ugualmente all'azione delle cause infettanti specifiche, l'esito assume direi quasi tutto il valore che si potrebbe dare ai risultati ottenuti in un grande laboratorio che avesse sperimentato su grande e propizio materiale (4).

Le vaccinazioni sono state in seguito ulteriormente applicate fra le truppe coloniali inglesi, e oggi, come riferisce Nattan-Larrier (5), si può dire che su un totale di 21,815 vaccinati si ebbero solo 318 casi di tifo, mentre su un totale di 163,011 non vaccinati se ne ebbero 4236 con una cifra di morbilità quindi di 1.4 % per i primi e di 2.6 % per questi ultimi.

Smith (l. c.) conferma questi buoni risultati, e mentre fa rilevare quale flagello costituisca per le truppe coloniali l'infezione tifosa, asserisce che il vaccino di Wright ha ridotto da 3 ad 1 la morbilità per tifo.

---

(1) Sitzungsber. d. med. Soc., 28 ott. 1901.
(2) Brit. med. jour., 1901.
(3) Brit. med. jour., 2278.
(4) WRIGHT. The Lancet, 1900, vol. 1°. — The Lancet, 1900, vol. 2°. — The Lancet, 1901, vol. 1°. — Deut. medic. Wochens., 1901 (Vereinsbeil.), n. 43. — The Lancet, 1903.
(5) La Presse médicale, n. 98, 1904.

Naturalmente questo vaccino, come qualunque altro materiale immunizzante, deve essere saputo adoperare, senza di che si potrebbe attribuire — come Wright dice che sia avvenuto ad alcuni medici del Sud-Africa — ad una deficienza del vaccino quello che va ascritto ad una deficienza del metodo di impiego. E' necessario innanzi tutto, come misura elementare, di sbattere il liquido prima di inocularlo, in modo che la massa dei batteri possa distribuirsi uniformemente, e di aver cura, sopratutto, della quantità che si inietta, giacchè il Wright ha notato che le grandi dosi sono altrettanto inefficaci quanto le piccole dosi.

Un quesito poi di grande interesse pratico è quello di conoscere quanto tempo è necessario perchè — iniettato il vaccino — lo stato immune si stabilisca, e quanto dura la immunità in tal modo acquisita.

In quanto alla prima questione il Wright ammette che sia necessario un periodo di tempo di non meno di 8-10 giorni perchè la immunità si acquisti; in quanto alla durata dello stato immune le opinioni non sono molto d'accordo. Wright fondandosi su quello che egli ha potuto osservare fra i militari nelle Indie crede che questo stato immune si mantenga per non meno di tre anni. Il Marx (1) però ha potuto osservare che un inserviente di laboratorio, vaccinato con vaccino Wright, e nel quale 12 giorni dopo l'avvenuta vaccinazione il titolo del potere battericida del siero di sangue si elevò a 0. 025, tre mesi più tardi essendo stato inoculato con lo stesso campione di tifo servito alla preparazione del vaccino, ammalò di tifo. Evidentemente, però, nell'osservazione di Marx c'è quello artificio di laboratorio che male può dare l'idea di quello che avviene in natura, dove la importanza della causa infettante non si potrà mai trovare od avere quella entità che ha nel caso di una infezione artificiale con cultura pura. Mettendo quindi in quarantena questa precedente osservazione, non si può fare a meno, però, di dare il dovuto valore ad un'altra osservazione di Crombic (2), il quale vedeva ammalare di tifo un medico militare sei mesi dopo l'avvenuta vaccinazione, e — fatto teoricamente e praticamente importante — proprio 14 giorni dopo che nel sangue di tale medico era stata constatata la presenza di agglutinina specifica.

Cosicchè concludendo fra i pochi metodi preconizzati di vaccinazioni antitifosa, l'unico autenticamente provato, il metodo Wright, per i risultati da esso finora dati, può ritenersi di sicuro come un metodo di specifica profilassi di non dubbia efficacia.

Un altro mezzo di conferire all'uomo un solido stato immune specifico sarebbe quello della immunizzazione così detta passiva, ottenuta

---

(1) *L. c.*
(2) The Lancet, 3 maggio 1902.

cioè a mezzo di iniezioni di siero specifico; da questo lato però la bibliografia è perfettamente negativa, ciò che mi induce a passare senza altro alla parte speciale di questo studio.

II. — PARTE SPECIALE.

A) La profilassi coi vari mezzi di immunizzazione attiva.

Quando da quello che si è fatto o si è tentato di fare nell'uomo passiamo a ciò che in materia di immunizzazione attiva si è fatto nel campo puramente sperimentale, ci si trova in un campo così vasto che male si presterebbero le osservazioni eseguite ad essere esposte in ordine cronologico. E a maggior ragione, poi, questa esposizione, così fatta, male risponderebbe allo scopo in uno studio comparativo, come quello che ho avuto intenzione di fare e di cui ora esporrò i risultati

Ho raggruppato, quindi, tutti quanti, o almeno i più essenziali metodi di immunizzazione suggeriti dai diversi autori, in quattro categorie principali, ponendo nella prima le esperienze di vaccinazione eseguite con culture vive, in una seconda quelle con culture morte, in una terza quelle coi filtrati di culture batteriche su terreni liquidi, in una quarta quelle coi prodotti vaccinanti estratti con procedimenti speciali dalle brodo-culture *in toto*, ed in una quinta ed ultima, infine, le numerosissime esperienze eseguite a mezzo di prodotti solubili estratti dai corpi batterici.

1. Culture vive.

Su questa via i primi passi sono assai remoti, e risalgono a Fränkel e Simmonds (1) i quali, sostenitori con Michael, A. Fränkel, Seitz, ecc., che tutto il quadro sintomatologico e anatomo-patologico del tifo addominale era da devolversi all'azione non della moltiplicazione del germe specifico che Gaffky veniva di coltivare allo stato di purezza, ma a quella dei suoi prodotti tossici. Questi due osservatori notavano che i conigli i quali, infettati, erano sopravvissuti alla infezione, mostravano di avere acquistato una certa immunità, in quanto che essi in seguito ad una nuova infezione o rimanevano del tutto in buona salute, o mostravano in ogni caso di soffrire, sotto l'azione del nuovo veleno, meno di animali nuovi, senza, però, in ogni caso venire a morte. Sirotinin (2) tocca anche

---

(1) *Die aetiol. Bedeut. d. Typhusbacillus*. Hamburg u. Leipzig, 1886 e Zeits. f. Hyg., vol. 2°, pag. 138.
(2) Zeits. f. Hyg., vol. 1°, pag. 465.

lui tale quistione, ma la lascia irresoluta in quanto che egli notava che per lo più si possono constatare in seguito ad una seconda infezione indubbi e caratteristici segni di malattia, i quali giungono perfino a condurre a morte l'animale.

Queste ricerche vennero poco appresso continuate da Beumer e Peiper (1) e da Chantemesse e Widal (2), e per esse poterono gli autori vedere che se le reinoculazioni si fanno con non troppa frequenza e con dosi di materiale infettante progressivamente crescenti, si può arrivare ad ottenere, come essi ottennero, che su dieci topi, i quali nello spazio di poco più di un mese progressivamente erano stati iniettati con 1, 3, 6, 10 gocce di emulsione di bacilli del tifo coltivati su patata, ad onta della introduzione nel loro cavo peritoneale di una forte dose di germi specifici, solo uno morì, tutti gli altri rimasero in vita. In seguito l'osservazione è stata così abituale e generale per gli studiosi dell'argomento che sarebbe opera altrettanto lunga quanto vana il voler riferire le innumerevoli conferme. Ciò però riguarda l'impiego di germi vivi e virulenti. Ma è principio già da lungo tempo assodato in batteriologia che volendo adoperare germi vivi a scopo di immunizzazione, servono a tale scopo e le piccole dosi di germi virulenti, come le dosi più grandi dello stesso germe attenuato, tecnica questa di cui gli esempi classici ci sono stati per il primo dati da Pasteur col colera dei polli, col vaccino anticarbonchioso e con quello antirabbico.

E poichè per riguardo al tifo è questo un argomento fino ad ora poco trattato, così dati gli scopi prefissimi, ho voluto, accanto alle esperienze di vaccinazione con culture vive e virulente, eseguirne ancora altre con culture vive attenuate, tenendo però ora di mira, come del resto in tutto quanto il lavoro, nello stabilire le esperienze e nel giudicarne i risultati, se l'azione vaccinante indiscutibile che si ottiene con la iniezione di ripetute dosi di cultura, si può anche ottenere con una unica iniezione, constatazione questa della massima importanza quando si pensa che scopo mio finale è quello di poter dire quale fra i vaccini adoperati meglio si presta ad essere eventualmente usato nell'uomo.

Ho proceduto quindi nelle esperienze nel modo seguente: Un campione di bacillo del tifo, la cui dose minima letale per iniezione intraperitoneale di brodo-cultura di 24 ore nelle cavie è stata riconosciuta uguale a 0.30%, si lascia sviluppare per 24 ore a 37° in brodo nutritivo ordinario e quindi con essa si iniettano tre cavie sottocute (addome), una con 1 cmc. di cultura, un'altra con $1/2$, una terza con $1/10$ di cmc. Si ha già, infra le 24 ore, forte edema al punto di inoculazione, edema che per la prima cavia occupa quasi per intero la regione addominale; in tutte

(1) Zeits. f. Hyg., vol. 2°, pag. 110.
(2) An. d. l'Ins. Pasteur, 1892.

si ha cospicua ipertermia. L'edema si va man mano riducendo nei giorni successivi, e finisce per dar luogo ad una ulcerazione della cute di ampiezza differente nelle due prime cavie. Nella terza l'edema si riassorbe del tutto senza altra conseguenza. Otto giorni dopo l'inoculazione le tre cavie avevano ripreso il loro peso, e al decimo giorno furono tutte assieme ad un controllo iniettate nel cavo peritoneale con una volta e mezza della D. M. L. di brodo-cultura. Muore col controllo, delle tre cavie trattate, solo l'ultima.

L'esperienza è stata ripetuta con culture attenuate di bacillo del tifo. A questo scopo, fatti innesti in brodo della cultura servita alla precedente esperienza, lascio sviluppare per tre giorni a 40°. Trascorso questo tempo le culture ottenute appariscono con brodo leggermente ma uniformemente intorbidato e forte deposito al fondo. Agito e inietto, con questo materiale, quattro cavie sottocute, con le quantità rispettive di 5, 3, 1 0.5 cmc. Segue anche in queste cavie edema alla regione dell'addome che dalla ampiezza di un cinque franchi nella prima va fino alla ampiezza di un due centesimi nell'ultima. Ipertermia cospicua in tutte. Nelle prime due all'edema segue l'ulcerazione, nelle altre due l'edema si riassorbe. Sette giorni dopo l'avvenuta iniezione, avendo constatato che tutti gli animali erano ritornati al loro peso originario, pratico nel peritoneo la iniezione di prova (1.50 D. M. L.), e infra le 24 ore, assieme al controllo, vedo morire le due ultime cavie: sopravvivono le altre due invece, definitivamente.

Riassumo queste esperienze nella tabella seguente:

TABELLA I.

	Numero d'ordine delle cavie	Quantità di cultura iniettata — Cmc.	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Tempo decorso fino alla iniezione di prova	Esito della iniezione di prova
Culture viventi	1ª	1.0	Edema e ulcerazione	40°.5	10 giorni	—
	2ª	0.5	Id. id.	41°.0	»	—
	3ª	0.1	Edema	39°.9	»	+
Controllo	.	..	..	..	..	+
Culture attenuate al calore	1ª	5.0	Edema e ulcerazione	41°.2	7 giorni	—
	2ª	3.0	Id. id.	40°.0	»	—
	3ª	1.0	Edema	40°.2	»	+
	4ª	0.5	Id.	39°.7	»	+
Controllo	..	..	.	..	..	+

2°. Esperienze di immunizzazione con culture morte.

Su questo campo le prime ricerche sono state eseguite da Kliokwicz (1), il quale con una sola iniezione di tifo-cultura uccisa proteggeva i ratti da iniezioni ulteriori di culture vive, morte, e dall'azione tossica di filtrati batterici.

Seguono le osservazioni di Brieger, Wassermann e Kitasato (2), i quali dopo aver notato che non sempre hanno un effetto profilattico costante le vaccinazioni degli animali fatte col metodo ora descritto di Beumer e Peiper, pur non scostandosi da questi autori nella maniera d'intendere la patogenesi del tifo, se ne discostano invece nel suggerire un efficace metodo di immunizzazione. Per essi difatti sembra dimostrato che « la morte degli animali da esperimento in seguito alla introduzione, nel loro corpo, di bacilli del tifo, è da riguardarsi come l'esito di una intossicazione » e che se si vuole proteggere gli animali dalla morte per questo germe specifico, bisogna loro conferire la resistenza al veleno (Giftfestigung) più che una vera immunità, cioè più che la possibilità di ostacolare la moltiplicazione dei germi stessi, i quali nell'organismo di un animale reso resistente al veleno non sarebbero più dannosi dei più banali batteri acquatili. Li seduceva evidentemente la scoperta del Behring a proposito della immunità antitossica nella difterite, nonchè quella dell'Ehrlich per la immunità contro la ricina, l'abrina, ecc. Constatando però che le culture morte fatte sui comuni terreni nutritivi sono troppo tossiche per poter riuscire efficacemente vaccinanti, partendo dalla osservazione che molte delle ghiandole così dette a secrezione interna hanno una grande importanza per la neutralizzazione dei prodotti tossici del ricambio materiale, adoperarono il succo di queste ghiandole (timo, gangli linfatici, ecc.), mescolato al brodo nutritivo con l'idea che potessero le loro sostanze attive, solubili in acqua, già *in vitro* spiegare una azione neutralizzante sui prodotti tossici del ricambio materiale dei batteri. E poterono, difatti, constatare che le culture di b. del tetano, difterite, tifo, del mal rosso dei suini, vibrione del colera, streptococco dell'eresipela ottenute su brodo-timo erano molto meno tossiche delle loro congeneri ottenute in semplice brodo-peptone, e servivano con maggiore, anzi con assoluta sicurezza, alla vaccinazione degli animali da esperimento. Limitandomi ad esporre quello che gli autori ottennero per il tifo, dirò che servendosi di un campione di tifo di alta virulenza (0.1 cmc. di una brodo-cultura di 3 giorni uccideva un topo in 24 ore e nello stesso tempo 0.5 cmc. uccidevano una cavia di 300-400 gr.), lo innestarono in brodo-timo, e tennero le culture per tre giorni alla stufa. In questo tempo « le sostanze antitossiche contenute nelle cellule del timo spiegavano tale una azione attenuante sul veleno del tifo che per un ulteriore riscaldamento a 60° C. (15 minuti) la quantità necessaria alla vaccinazione poteva venire introdotta nel corpo dell'animale senza alcun pericolo,

(1) Kliokwicz, 1888, citato da Bitter — Zeits. f. Hygiene, vol. XII, pag. 298.

(2) Zeits. f. Hygiene, vol. XII, a. 1892, pag. 137.

cosa che i comuni brodi non permettono di ottenere ». Di questo materiale vaccinante essi facevano nei topi una sola iniezione di 0.5 cmc., nelle cavie invece tre iniezioni a 5-7 giorni di intervallo di 3 cmc. ciascuna nel peritoneo; le iniezioni non arrecavano nessun disturbo. Dieci giorni dopo infettati questi animali con dosi di cultura sicuramente mortali sopravvissero tutti, ciò che induceva gli autori a concludere che mediante tale trattamento, senza eccezione, tutti gli animali potevano in tal modo venire protetti da una tifointossicazione per sè stessa mortale.

Gli stessi autori poi, oltre che di questo ora riferito metodo di vaccinazione, si servono ancora di un altro procedimento per vaccinare le cavie. Essi scaldano a 80°-90° delle culture virulente, le riducono per evaporazione a $^1/_{10}$ del loro volume, precipitano con alcool e ottengono una sostanza di cui due centigrammi bastano per dare, infra 48 ore, l'immunità alle cavie.

Come però Brieger, Wassermann e Kitasato dicevano infedele il metodo di Beumer e Peiper, così Chantemesse e Widal dànno lo stesso giudizio del metodo degli autori tedeschi, e ne suggeriscono per conto loro un altro, fondato sull'impiego delle sostanze solubili provenienti dalle brodo-culture (1). A questo scopo essi lasciano per 15 giorni alla stufa (37°) i loro matracci di brodo innestati con tifobacillo, e poi li sterilizzano a 100°. Di questo materiale essi iniettano 16-20 cmc. in una cavia, frazionando tale quantità totale in 3-4 iniezioni alla distanza di qualche giorno l'una dall'altra. Alcune muoiono durante il periodo di immunizzazione (2 su nove) e su 7 cavie sopravvissute, inoculate 8 giorni dopo l'ultima iniezione con 2 cmc. di cultura virulenta nel peritoneo, solo 5 resistono. Ugualmente su 15 conigli, solo 9 resistono al trattamento preventivo, e di questi, inoculati 1 mese dopo l'ultima iniezione con una dose di tifocultura, nessuno morì.

Indipendentemente, poi, dalla pubblicazione di Chantemesse e Widal, Sanarelli (2) nello stesso periodo di tempo pubblicava le sue osservazioni sulla febbre tifoide sperimentale, e sul riguardo della profilassi specifica, dopo avere accennato soltanto che è possibile l'immunizzazione con germi attenuati, dati gli inconvenienti osservati, si ferma a dire che egli si è deciso per la vaccinazione a mezzo dei *prodotti solubili* ottenendo dei risultati eccellenti, in quanto che egli riusciva a vaccinare gli animali con una grande facilità e con certezza assoluta. Questo autore esclude, dalle sue esperienze, i topi come molto sensibili, ed è stato tratto anche ad escludere i conigli i quali facilmente dimagrano e muoiono nel tempo necessario alla immunizzazione, ed ha esperimentato sulle cavie. Egli tiene le culture in brodo di un virus attivissimo per 8-10 giorni a 37°, poi sterilizza a 120°, e inietta quindi 16-18 cmc. di questo liquido sottocute nello spazio di 5 giorni a cavie di 400-500 gr. le quali già fin dal 4° giorno si mostrano senza eccezione immuni contro la infezione.

Prima di Sanarelli e prima ancora di Chantemesse e Widal, Bruschettini (3) notava che ripetute iniezioni sottocutanee di culture in brodo

(1) An. d. l'Ins. Pasteur, 1892, pag. 755 (novembre).
(2) An. d. l'Ins. Pasteur, 1892, p. 721 (novembre).
(3) Riforma medica, agosto 1892.

tenute per un'ora a 60° in quantità di 50 cmc. conferiscono ai conigli l'immunità contro il bacillo del tifo. Lo stesso stato immune — fatto teoricamente notevole — poteva più facilmente venire conseguito adoperando invece che culture in brodo, culture in sangue, anch'esse uccise a 60°, e di cui bastavano tre iniezioni di 5 cmc. ciascuna per raggiungere l'effetto desiderato.

Tutti quanti poi hanno ricercato e osservato le proprietà specifiche del siero degli animali così immunizzati sia dal punto di vista profilattico come anche per riguardo al suo potere curativo, ma queste ricerche eseguite per la soluzione di speciali problemi, sarebbe un fuor d'opera riferire in questo sunto del lavoro, per il quale, alla dimostrazione della efficacia dei vari metodi di vaccinazione, basta la più probatoria e dimostrativa delle prove, quella della resistenza all'agente specifico degli animali trattati di fronte ai non trattati.

Però, per quanto essi rappresentino un progresso sulle vaccinazioni con culture vive in quanto che viene eliminato, per quello che dai dati riferiti da questi autori risulta, la forte reazione e i fatti di necrosi locale che hanno il loro esito nell'ascesso e nella ulcerazione della cute, non possono tuttavia rappresentare un modo conveniente di vaccinazione dell'uomo in quanto che per lo acquisto di un solido stato immune, anche lasciando da parte ogni discussione sulla maggiore o minore efficacia vaccinante del materiale adoperato, è necessario rinnovare tre, quattro, cinque volte la iniezione di cultura sterilizzata, cosa che già di per sè costituisce un ostacolo assai grande ad una pratica applicazione.

Non mi sono quindi fermato a studiare di persona la efficacia di questi metodi di immunizzazione, ed ho rivolto invece la mia attenzione al metodo di vaccinazione di Pfeiffer e Kolle e a quello di Wright di cui ho già fatto parola nella parte generale di questo lavoro.

E passo senz'altro quindi a riferire le esperienze fatte con questi due vaccini.

Vaccinazione col metodo di Pfeiffer e Kolle. — Con un campione di tifo di nota virulenza (D. M. L. per brodo-culture di 24 ore = 0.40 % nelle cavie per via intraperitoneale) si fanno innesti in agar per strisciamento, che vengono tenuti per 24 ore a 37°. Prelevando quindi le patine culturali con un'ansa di platino di 1 mm. didiametro, si stemperano le masse bacillari in brodo-peptone in modo che ogni centimetro cubico contenesse un'ansa di patina. L'emulsione viene tenuta per una ora a 56° a bagnomaria, e se ne constata la sterilità prelevando alcune gocce di liquido con cui si insemenzano dei tubi di brodo nutritivo, che vengono lasciati a 37° per 24 ore. Osservata in questi tubi di prova la completa assenza di ogni sviluppo batterico, col vaccino si iniettano tre coppie di cavie sottocute, con quantità progressivamente crescenti di esso, e otto giorni dopo vengono tutte, per via intraperitoneale, infettate con cultura pura di tifo bacillo in brodo.

L'andamento e l'esito della esperienza è stato quale viene riferito nella tabella seguente:

TABELLA II.

Cavie	Peso delle cavie	Quantità di vaccino iniettato — Cmc.	Reazione locale	Temperatura rettale dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata dopo otto giorni — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª	Circa 300 grammi ciascuna.	1	Edema di varia entità, che si riassorbe in non più di 5 giorni, senza dar luogo a ulcerazione della cute.	41°	0. 45 °/₀	—	D. M. L. della brodocultura di prova = 0. 35 °/₀.
» 2ª		1		40°. 2	»	—	
» 3ª		$^1/_{10}$		40°. 2	»	+ (r)	
» 4ª		$^1/_{10}$		39°. 7	»	+	
» 5ª		$^1/_{20}$		39°. 8	»	+	
» 6ª		$^1/_{20}$		39°. 5	»	+	
Controllo	..	..	..	..	»	+	

Ciò posto — e quello che ora dico va riferito a tutti quei vaccini studiati in cui esperienze analoghe a quelle di cui ora dirò ho potuto eseguire — potrebbe essere sufficiente per la dimostrazione dei limiti di efficacia del vaccino l'osservazione di quanto sopra è stato descritto. Ma in vista del quesito postomi nella parte generale di questo lavoro e cioè se può il potere preventivo e profilattico del siero di sangue degli animali trattati costituire un indice sufficiente della raggiunta immunità, iniettata sottocute una cavia con 1 cmc. del vaccino adoperato per le precedenti esperienze, dose riconosciuta come sicuramente vaccinante, dopo otto giorni venne svenata, e raccolto il siero di sangue, con questo furono istituite le seguenti esperienze.

Tre cavie di circa 300 gr. ciascuna vengono iniettate nel cavo peritoneale con una miscela di cmc. 0.45 % di brodo-cultura di 24 ore (D. M. L. = 0.35 %) e, rispettivamente, di 1, $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ di cmc. del siero di sangue in esame. Delle tre cavie si salva solo la prima, ciò che ci permette di dire, riferendoci ai grammi di peso dell'animale inoculato, e alla quantità di siero adoperato che il *potere battericida di questo siero resta inferiore a un titolo di* 1 : 3000 *e superiore a* 1 : 300.

Altre tre cavie sono state inoculate sottocute rispettivamente con $^1/_{10}$, $^1/_{50}$, $^1/_{100}$ di cmc. di siero, e 24 ore dopo sono state iniettate nel cavo peritoneale con cmc. 0.45 % di brodo-cultura. Il giorno appresso trovo

morte le ultime due cavie, viva la prima, ciò che ci permette di dire che il *valore preventivo di questo siero è superiore ad un titolo di* 1 : 3000 *e inferiore a un titolo di* 1 : 15000.

Assodata, poi, l'efficacia del vaccino, una soluzione bisognava dare al seguente quesito, se, cioè, iniettato il vaccino nell'animale, ed eventualmente nell'uomo, esso non induce nell'organismo vivo modificazioni tali da abbassarne la resistenza, rendendolo magari più recettivo verso la specifica infezione, chè certo sarebbe assai grave dànno quello di vedere dopo ed a causa della iniezione vaccinale risvegliarsi una infezione ancora latente, o peggio ancora venire trasformata in una grave infezione quella che senza la iniezione del vaccino avrebbe potuto avere un decorso lieve, e forse anche abortivo.

Ricordo di fatti a questo proposito quello che sperimentalmente hanno constatato Sanarelli (l. c.), Chantemesse e Widal (l. c.), e cioè come possa la contemporanea iniezione negli animali di culture morte di b. *coli*, di b. proteo, di streptococco servire benissimo ad esagerare la virulenza di un qualunque campione di b. del tifo attenuato; e come possano certe sostanze estratte dalle tifo-culture servire ugualmente a rendere mortale una infezione da tifo negli animali, infezione che per sè sola sarebbe riuscita innocua (1). Il Kolb e lo Pfeiffer riferendo sugli effetti del loro vaccino dicono che li mette al riparo da questa obbiezione i tentativi di batterioterapia del tifo addominale fatti da Fränkel (2); questo autore difatti ha veduto che su 57 casi di tifo addominale nell'uomo l'iniezione di culture morte di bacillo del tifo, a parte gli effetti terapeutici che egli ha creduto — pur troppo senza ulteriore conferma — di ottenere con queste iniezioni, non aggravava affatto il corso della malattia. Quando si pensa però che il Fränkel adoperava le culture in brodo-timo di cui Wassermann fa rilevare la scarsa tossicità di fronte alle ordinarie brodo-culture, e alle tenui quantità che di queste stesse culture venivano iniettate (½-1 cmc.) non si può senz'altro condividere l'ottimismo dei due ricordati autori tedeschi, e non mi è parso di poter fare a meno di stabilire con una apposita ricerca sperimentale se la quantità di vaccino riconosciuta efficace per la cavia, può, data una infezione attenuata in un animale di questa specie, esagerarne gli effetti e portare a morte l'animale stesso, o indurre in esso disturbi generali di qualche entità.

Queste esperienze relative a quella che potremmo chiamare *azione adiuvante e predisponente del vaccino*, sono state sempre da me eseguite per tutti i vaccini riconosciuti efficaci, e nel caso ora in esame ho proceduto come segue:

---

(1) A. Paladino-Blandini. Gazzetta int. di medic. pratica, 1903.
(2) Deut. medic. Wochens., 1903, n. 41.

Due cavie sono state inoculate nel peritoneo con $^{8}/_{10}$ della D. M. L. di brodo-cultura di tifo, e contemporaneamente una, e l'altra 24 ore dopo vengono iniettate sotto-cute con un centimetro cubico di vaccino. Sopravvivono entrambe; ciò che ci permette di dire che la *quantità utile* di vaccino non spiega sugli animali attaccati da una infezione non mortale, una rilevante azione nociva nè predisponente, nè adiuvante.

Altro lato e non meno importante della quistione delle vaccinazioni è il sapere quanto dura lo stato immune artificialmente conferito.

A questo riguardo tre cavie sono state iniettate sottocute ciascuna con 1 cmc. di vaccino; una di esse viene due mesi dopo inoculata nel cavo peritoneale con cmc. 0.65 % (D. M. L. = 0.50 %) di tipo-cultura assieme ad un controllo, e constato che mentre muore in circa 14 ore il controllo, sopravvive definitivamente la cavia vaccinata. Un mese appresso, tre mesi dopo, cioè, l'avvenuta vaccinazione, un'altra delle tre cavie viene inoculata con una dose mortale di tifocultura; e poichè la cavia soccombe alla infezione, ripeto la inoculazione nell'ultima cavia rimasta. Anche questa, però, subisce la stessa sorte della precedente, cosicchè si può ammettere che *lo stato immune conferito alla cavia a mezzo del vaccino di Pfeiffer e Kolle non dura oltre il secondo mese.*

Vaccino di Wright e Semple. — Dell'uso fatto di questo vaccino sull'uomo e dei risultati che con esso si sono avuti, mi sono già occupato nella parte generale. Esporrò qui, pertanto, esclusivamente le esperienze di laboratorio da me eseguite:

Con un campione virulento di bacillo del tifo (D. M. L. = 0.30 %) si innestano 200 cmc. di brodo nutritivo ordinario, contenuti in un matraccio di Erlenmeyer e coperti da uno strato di olio di 1 cm. di spessore. La cultura è stata tenuta in termostato per 4 settimane a 37° C. e quindi sterilizzata a 60° per un'ora. Dopo di che, assicuratomi con prove culturali della sua sterilità, il vaccino addizionato di cmc. 0.3 % di acido fenico, viene distribuito in fialette di vetro che si saldano alla lampada e restano conservate all'oscuro e in luogo fresco per tutta la durata delle esperienze.

Ho eseguito innanzi tutto il suo *controllo di efficacia* iniettandone sottocute a cavie di circa 300 gr. quantità decrescenti da 4 ad $^{1}/_{10}$ di cmc. Nessuna delle cavie muore, ma in tutte, entro limiti variabili con la quantità del vaccino iniettato, si ha edema al punto di inoculazione, ed elevazione di temperatura nelle prime 24 ore, che in qualche cavia ha raggiunto anche i 41° C. L'edema si va man mano riassorbendo e in un massimo di sei giorni esso è già completamente scomparso in tutte le cavie, senza lasciare indurimenti, nè molto meno dar luogo ad ulcerazioni.

Trascorsi otto giorni dalla iniezione del vaccino, e constatate le normali condizioni della temperatura rettale, tutte le cavie, assieme ad un controllo, vengono inoculate nel cavo peritoneale con cmc. 0.45 % di brodo-cultura di tifo (D. M. L. = 0.35 %), ottenendone quell'esito che espongo nella tabella seguente:

TABELLA III.

Cavie	Peso delle cavie	Quantità di vaccino iniettato — Cmc.	Reazione locale dopo 24 ore	Temperatura rettale dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata dopo otto giorni — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª	Circa 300 grammi ciascuna.	4	Edema che occupa quasi tutta la regione dell'addome nella 1ª cavia e si riduce alla larghezza di una moneta da due centesimi nelle ultime tre.	41° C	0.45 %	+	D. M. L. della brodocultura di prova = 0.35 %.
» 2ª		2		40°.8	»	—	
» 3ª		2		40°.2	»	—	
» 4ª		1		39°.7	»	—	
» 5ª		0.5		39°.9	»	—	
» 6ª		0.1		39°.5	»	—	
» 7ª		0.1		39°.7	»	+	
Controllo	..	..	..	..	»	+	

Da questo esperimento risulta che i limiti di efficacia di questo vaccino sulla cavia stanno fra $^1/_{10}$ di cmc. e 2 cmc., e che conformemente a quello che Wright aveva avuto campo di osservare personalmente (v. p. generale) le dosi troppo forti, come quelle troppo piccole di vaccino sono incapaci di conferire quel solido stato immune che è invece conferito dalle dosi medie; e senza stare ora ad indagare quali siano le ragioni per cui il fenomeno avviene, a me basta di averlo potuto sperimentalmente riprovare per dire come nell'impiego pratico grande cura va posta nello stabilire la dose utile del vaccino da adoperare, onde non esporsi ad insuccessi che sono meno da attribuirsi al metodo in sè, e più alla maniera della sua applicazione.

Partendo quindi dal dato che 1 cmc. di vaccino iniettato sottocute è sufficiente a conferire l'immunità ad una cavia di 300 gr., inoculata con tale quantità di vaccino una cavia, la ho svenata dopo otto giorni, ed ho eseguito le solite ricerche per constatare il potere battericida, ed il potere preventivo del siero.

Per riguardo alla prima serie di ricerche quattro cavie di circa 300 grammi ciascuna sono state inoculate nel peritoneo con una mescolanza di cmc. 0.50 % di brodo-cultura di tifo (D. M. L. = 0.40 %) e rispettivamente di $^1/_{1000}$, $^1/_{100}$, $^1/_{10}$, $^1/_2$, cmc. di siero, assieme ad un controllo inoculato con la sola tifo-cultura. Infra le 24 ore muoiono tutte le cavie inoculate tranne una, quella iniettata con cultura e $^1/_2$ centimetro cubico di siero, ciò che mi consente di dire che il *potere battericida del siero di sangue di questa cavia, di sicuro immunizzata, sta al di sotto di un titolo di* 1 : 3000.

Passando quindi alla determinazione del potere preventivo di questo siero, ho inoculato per via sottocutanea tre cavie di circa 300 gr. con $^1/_2$, $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ di cmc. di siero, e il giorno appresso le ho tutte, assieme ad un controllo, infettate per via intraperitoneale con 0.50 % di brodo-cultura (D. M. L. = 0.40 %).

Di queste cavie, oltre il controllo, muore anche quella trattata in precedenza con $^1/_{100}$ di siero; le altre due sopravvivono definitivamente, dimostrando in tal modo per il fatto in sè che il potere profilattico del siero di questa cavia immune si eleva ad un titolo superiore a quello di 1 : 3000, e dimostrando ancora una volta — se pure ciò è necessario dopo la classica opera del Metchnikoff — come quando esistono siano da ritenersi quali proprietà distinte e indipendenti l'una dall'altra, il potere profilattico ed il battericida del siero di animali immuni.

Le stesse esperienze ho ripetuto col siero di sangue di una cavia svenata 8 giorni dopo aver ricevuto una iniezione di 4 cmc. di vaccino, dose riconosciuta come inefficace a immunizzare l'animale, notando che di tre cavie inoculate con $^1/_2$, $^1/_{10}$, $^1/_{50}$ di cmc. di siero e 0.50 % di brodo-cultura nel peritoneo, moriva solo l'ultima assieme al controllo, e che di altre tre iniettate con $^1/_2$, $^1/_{10}$, $^1/_{50}$ di cmc. di siero e dopo 24 ore con cmc. 0.50 % di brodo-cultura nessuna se ne è salvata. Di conseguenza avremmo che elevando la quantità di vaccino iniettato alla cavia si eleva il potere battericida del siero fino a raggiungere un titolo non inferiore a 1 : 3000, mentre con la mancata comparsa dello stato immune si abbassa il titolo del potere profilattico anche al di sotto di 1 : 600.

In quanto allo studio dell'azione predisponente tre cavie sono state iniettate nel peritoneo con cmc. 0.30 % di brodo-cultura (D. M. L. = 0.40 %) e contemporaneamente, una è stata iniettata sottocute con 4 cmc., una con 2 e una con 1 cmc. di vaccino. Di queste tre cavie muore per setticemia da tifo solo la prima cavia, restano in vita le altre due. Le stesse quantità di vaccino, iniettate nella identica ma-

niera ad altre tre cavie sopravvissute ad una inoculazione fatta 24 ore prima di tifo-cultura in dose uguale alle precedenti, restano senza effetto di sorta. Riassumo per maggior chiarezza nella tabella seguente i risultati di queste due esperienze da cui risulta come in ogni caso la quantità utile di vaccino capace di immunizzare la cavia, non facilita il compito di una infezione per se stessa poco efficace, nè riesce a risvegliare il processo infettivo specifico di cui l'animale è già riuscito a liberarsi.

TABELLA IV.

Cavie	1ª giornata		2ª giornata		Esito 24 ore dopo l'iniezione della cultura di prova	*Osservazioni*
	Cultura iniettata — Cmc.	Vaccino iniettato — Cmc.	Cultura iniettata	Vaccino iniettato — Cmc.		
Cavia 1ª. . .	0. 30 °/₀	4	..	..	morta	D. M. L. de la cultura adoperata = cmc 0 40 °/₀.
» 2ª. . .	»	2	..	..	sopravvive	
» 3ª. . .	»	1	..	..	id.	
» 4ª. . .	»	..	..	4	id.	
» 5ª. . .	»	..	..	2	id.	
» 6ª. . .	»	..	..	1	id.	

A completare poi lo studio della efficacia del vaccino cinque cavie vengono nella stessa giornata iniettate con vaccino e quindi di tempo in tempo, una alla volta, infettate, constatando, come dalle qui elencate esperienze risulta, che lo stato immune del vaccino conferito non si protrae in questi animali che per uno spazio di tempo che sta fra il 4° e il 5° mese.

TABELLA V.

	Quantità di vaccino iniettato sottocute — Cmc.	Tempo decorso dal giorno della vaccinazione a quello della infezione di prova	Quantità di cultura iniettata nel peritoneo — Cmc.	Esito	D. M. L. della cultura di prova — Cmc.
Cavia 1ª	2	30 giorni	0.50 %	—	0.40 %
» 2ª	»	58 »	0.45 %	—	0.30 %
» 3ª	»	120 »	0 60 %	—	0.40 %
» 4ª	»	5 mesi	0.60 %	+	0.45 %
» 5ª	»	5 »	0.60 %	+	0.45 %

3. Esperienze di vaccinazione coi filtrati di culture su terreni liquidi.

I fatti e gli esperimenti relativi a questo lato del lavoro si rilegano per necessità alla quistione sempre controversa anche al giorno d'oggi, se cioè sia il caso di classificare il bacillo del tifo accanto ai più tipici batteri a secrezione tossica, come il b. della difterite, del tetano del botulismo, del pus bleu, o se — cosa che è apparsa più verosimile — non si debba includerlo in un altro gruppo di batteri dai primi nettamente differenziabili per il fatto che la tossina specifica è strettamente legata al corpo dei bacilli viventi, e che essa è dotata di caratteri di resistenza e di proprietà biologiche tali per cui è necessità distinguerla dalle tossine schiette (1) dei batteri a secrezione tossica. Nè deve sembrare un fuor d'opera la rivista che andrò a fare dei più importanti procedimenti preconizzati per la dimostrazione della tossina tifosa nei filtrati, in quanto che raggiunta questa dimostrazione non la quistione teorica soltanto, ma la più essenziale quistione pratica della immunità artificiale avrebbe più facile e più scientificamente corretta soluzione.

(1) OPPENHEIMER. *Toxine u. Antitoxine.* Jena, 1904.

Ed era anche guardando la cosa da questo punto di vista che Brieger (1) riferiva prima i suoi studi sulla tifotossina, le cui grandi promesse finirono per scomparire sotto i colpi della critica che di questa ptomaina fece un prodotto di decomposizione degli albuminoidi del terreno nutritivo sotto l'azione degli agenti chimici impiegati; e che più tardi poi lo stesso autore in collaborazione con C. Fränkel comunicava gli studi fatti sulle tossialbumine batteriche (2).

Questi due autori usavano culture in brodo, o in brodo-siero di bacillo della difterite, tifo, tetano, vibrione del colera, stafilococco aureo, come anche estratto acquoso di organi interni di animali morti di carbonchio ematico, filtravano alla Chamberland, concentravano il filtrato nel vuoto a 30° al terzo del suo volume, precipitavano con 10 volumi di alcool addizionato di qualche goccia di acido acetico, scioglievano il precipitato in acqua, saturavano con solfato d'ammoniaca, purificavano per dialisi. Da tutti i filtrati così trattati, e quindi anche dai filtrati di tifo-cultura, ottenevano come prodotto finale sul dializzatore delle albumine tossiche che essi classificano in due grandi gruppi in base alla loro maggiore o minore solubilità nell'acqua, e collocano un primo gruppo accanto alle siero-albumine, l'altro accanto alle globuline da cui tuttavia si distingue per la sua lenta e difficile solubilità in soluzione di cloruro sodico. A quest'ultimo gruppo apparterrebbe, con quella del colera e dello stafilococco aureo, anche la albumina tossica del tifo.

Inoltre, fondandosi sulle proprie esperienze eseguite sul veleno del colera, sulle osservazioni di Mosso a riguardo della ittiotossina, su quelle di Kobert e Stillmark a proposito della ricina, enunciano un concetto generale sulla natura dei prodotti tossici batterici, vegetali ed animali, e cioè che tutte queste sostanze velenose essendo di natura albuminoidea, devono essere comprese sotto la designazione unica di *tossialbumine*.

Ora a parte la confusione che l'uso di questa parola verrebbe a gettare nel campo della batteriologia mettendo in un fascio unico prodotti disparatissimi e sostanzialmente differenti, a parte che gli studi successivi hanno dimostrato per delle tossine schiette come la tetanica e la difterica che esse non sono affatto delle sostanze albuminoidi, rimanendo nel campo della tossialbumina del tifo, lo avere osservato che essa iniettata in una certa quantità è capace di uccidere i conigli, e che i sintomi di malattia che essa produce e le lesioni anatomiche indotte ricordano quello che si ha nel caso della iniezione di bacilli vivi in quantità mortale, non dice nulla per la sua specificità e per la sua esatta classifica fra le tossine. Io insisto su questo concetto che avrò spesso occasione di ricordare più in là nel lavoro, che su questo proposito serve male il quadro clinico ed il quadro anatomo-patologico indotto da un prodotto qualunque ottenuto dalle tifo-colture, in quanto che esso può essere ripetuto alla precisione con una sostanza (nucleina) che come è un costituente del corpo del tifobacillo lo è anche di una quantità di altri batteri patogeni e non patogeni (3)

---

(1) Weit. Unters. ü. Ptomaïne. Berlino, 1885.
(2) Berl. klin. Wochens., 1890, n. 11 e 12.
(3) A. Paladino-Blandini. Questi Annali, 1904, f. 2°.

e per mezzo della quale febbre, dimagramento, tumefazione delle placche di Peyer (1), tutto possiamo osservare senza che perciò si possa essere autorizzati a chiamare questa sostanza col nome di *tossina*, nè molto meno di indicarla come tossina specifica del tifo. Noi possiamo dare il nome di *tossina* solo a quelle sostanze che per possedere i due gruppi classici stabiliti da Ehrlich, l'aptoforo ed il tossoforo, sono capaci per ciò stesso una volta introdotte nell'organismo animale di dar luogo da un lato a dei fenomeni d'intossicazione — poco importa di quale entità, giacchè male si apporrebbe chi volesse domandare a tutte le tossine batteriche l'attività della tossina tetanica o difterica — e di dar luogo dall'altro lato alla produzione di una specifica antitossina.

Ora questo criterio, per non dire di altri, manca a noi oggi per poter dire se la tossialbumina del tifo isolata da Brieger, sia veramente la tossina specifica del germe, e poichè gli stessi autori che pure alla fine del loro citato lavoro si proponevano di riguardare in base ai loro studi la questione della immunità, non ci sono tornati sopra, mi è anche parso conveniente di non tentare io questa via e di escludere quindi la tossialbumina del Brieger dal campo delle mie ricerche.

Seguono alle osservazioni di Brieger quelle di Bitter (2), il quale però avendo constatato lo scarsissimo valore tossico dei filtrati alla candela di brodo-culture di tifo, certo che la tossina del germe fosse da ricercarsi nel corpo dei batteri, tralascia ogni esperienza di immunizzazione con questi filtrati, per adottare un procedimento di estrazione della tossina di cui questo non è il momento di occuparci.

Lo stesso va anche detto per la tossina di Sanarelli (3), il quale se esperimenta col liquido di brodo-culture, lo fa dopo aver sottoposto le culture stesse a tali manipolazioni per cui non agli eventuali prodotti secreti dei germi, ma ai prodotti di loro decomposizione va ascritta ogni azione biologica in questa tossina riscontrata.

Pfeiffer e Kolle (4) sono anch'essi di opinione che la tossina sia strettamente legata ai corpi dei batteri e rifiutano per le esperienze di immunizzazione di servirsi dei filtrati di brodo-culture per i quali osservano che il filtrato libero di germi di brodo-culture di tifo anche tenute per parecchi giorni a 37°, non basta neanche in dose di 5-6 cmc. non solo ad uccidere una cavia di 300 gr., ma neanche a farla ammalare, e negano la presenza di un veleno specifico nei filtrati di brodo-culture sostenuta da Sirotinin (5). Bandi (6) sostiene invece una opinione contraria.

Egli nel suo lavoro ha specialmente di mira gli studi già pubblicati di Bitter (l. c.) e quelli di Orlandi e Cesaris-Demel (7), i quali autori vedono inattivi i filtrati di brodo-culture anche se iniettati in dose di 20-25 cmc. nel peritoneo delle cavie; e crede che l'errore stia nell'uso fatto

---

(1) Id. Riforma medica.
(2) Zeits. f. Hyg. Vol. XII, p. 298.
(3) An. d. l'Inst. Pasteur, 1904.
(4) Zeits. f. Hyg. Vol. XXI, p. 224, 1896.
(5) Zeits. f. Hyg. Vol. I.
(6) L'Ufficiale Sanitario, 1898.
(7) Archivio per le scienze mediche, 1893.

di culture adulte, in cui la tossina secreta dal germe ha già avuto il tempo di decomporsi. Pigliamo, egli dice, delle brodo-culture di tifo di 24-48 ore di età, filtriamole su un piccolo filtro di Kitasato: il filtrato alla dose di 2-4 cmc. iniettato in cavie di 400-500 gr. sottocute o nel cavo peritoneale le uccide nel modo stesso in cui le uccide una quantità uguale della stessa brodo-cultura sterilizzata al calore, e più facilmente di quello che non facciano i germi di queste culture separati dal loro terreno di nutrizione ed iniettati nelle cavie previa emulsione in acqua e sterilizzazione. Egli combatte quindi l'idea che la tossina del tifo sia intimamente legata ai corpi batterici, e crede invece alla reale esistenza di una tossina solubile, rilevabile nel terreno liquido di cultura in un periodo di tempo in cui non è ammissibile che grande parte vi abbiano preso i prodotti di disfacimento delle cellule batteriche, e a riprova del fatto, e a sostenere la necessità dell'uso delle culture giovani per tali dimostrazioni, accenna alla constatazione che le culture vecchie di un anno allestite in brodo glicerinato sono meno tossiche delle culture giovani di 24-48 ore.

Il Rodet (1) è anch'egli della opinione che il bacillo del tifo sia capace di produrre una tossina solubile, dimostrabile nei filtrati di brodo-culture, e vuole che questa ricerca vada sempre fatta su culture di non più di 48 ore; filtrati che per quanto debolmente tossici, rispecchiano tuttavia quello che si vede con le culture in brodo sterilizzate al calore le quali non sono affatto più tossiche dei filtrati, cosa che starebbe contro l'opinione di una tossina intracellulare nel bacillo del tifo. Fino a questo punto, però, tanto per le osservazioni del Bandi, come per queste del Rodet, anche accettando senza condividerla l'opinione che filtrati e culture *in toto* sterilizzate, siano dotati di identica azione tossica, per il carattere fondamentale di cui ho avanti ricordato che deve essere dotata ogni sostanza per essere ritenuta una tossina, e per l'indole speciale di questa rivista sperimentale, sarebbe stato necessario avere dei dati per dire se l'iniezione di questi filtrati negli animali dà luogo alla produzione di antitossina, e se conferiscono agli animali stessi una specifica immunità. Ora, Bandi non ha fatto nessuna esperienza in proposito, e il Rodet non nota che la loro azione agglutinogena, azione agglutinogena del resto dimostratasi assai poco efficace. Egli difatti iniettando una serie di cavie in un periodo di 24 giorni quotidianamente con dosi progressivamente crescenti di filtrato, dopo avere così iniettato a ciascuna in tutto circa 78 cmc. di liquido, constatava che il siero di questi animali aveva sul bacillo del tifo un potere agglutinante che oscillava fra un titolo di 1: 20 a quello di 1: 100. Ora se per Rodet ciò doveva essere sufficiente per dare una solida prova di un acquisito specifico stato immune, non può viceversa, anche a prescindere dal basso valore agglutinante del siero, indurre noi oggi alla medesima deduzione, sia perchè in linea generale — come ho già avanti fatto notare — se i due fenomeni possono esistere, può anche l'uno presentarsi senza che l'altro vi si accompagni, e poi perchè da prove dirette a me risulta (2) che i filtrati di brodo-culture se hanno un reale potere agglutinogeno, mancano invece di proprietà immunizzanti.

---

(1) Comp.-rendus de la Soc. de Biologie, 1898, p. 756 e 774.
(2) A. Paladino-Blandini. Gazzetta int. di Medicina, 1903, n. 10.

A risultati invece più concreti è venuto Chantemesse, il quale abbandonando l'impiego di brodo-culture sterilizzate di cui ho già avanti tenuto parola, sostiene in una serie di comunicazioni alla stampa ed ai Congressi scientifici il concetto della tossina solubile del bacillo del tifo.

Per ottenere questa tossina egli si serviva dapprima (1) di una macerazione a freddo di milza e di midolla di ossa addizionata di un poco di sangue umano defibrinato, liquido che veniva innestato con un bacillo di alta virulenza; la cultura mantenuta per 36 ore a 37° dà luogo alla produzione di un velo superficiale che diminuisce gli effetti dell'ossigeno atmosferico sulla tossina secreta dal germe, tossina la cui produzione è al suo massimo verso il 5° giorno, mentre va poi in seguito man mano decomponendosi, fino a scomparire del tutto verso il 15° giorno. In seguito lo stesso autore (2) potè osservare che risultati ugualmente buoni si hanno adoperando come liquido di cultura il brodo Martin.

Il liquido è disposto in larghi matracci, ed innestato con un campione di tifo di fresco uscito dall'animale; si ha la solita pellicola superficiale. Dopo cinque giorni si filtra e si conserva il liquido al riparo dell'aria e della luce, e si ha in tal modo una tossina la quale uccide le cavie per iniezione intraperitoneale alla dose di 1 cmc. per 80 gr. di animale, mentre si mostra inattiva se introdotta per la via del tubo digerente. I conigli sarebbero tre volte più sensibili delle cavie; polli e piccioni sono quasi del tutto refrattari.

Ora, poichè è con questa tossina che lo Chantemesse prepara il suo siero, dotato di proprietà non solo preventive, ma antitossiche e curative, data per ciò stesso la dimostrata efficacia immunizzante di questo prodotto tossico, ho creduto conveniente di stabilire delle esperienze affine di poter dire se esso può venire utilmente impiegato come liquido vaccinale.

Vaccinazione con la tossina di Chantemesse. — In un pallone Fernbach vengono introdotti 200 cmc. di brodo Martin, e innestatolo con un campione di tifo virulento (D. M. L. per brodo-culture in. nel cavo per. della cavia = 0.30 %) ritirato il giorno precedente dalla milza di una cavia morta per setticemia tifica. Il matraccio è tenuto per 5 giorni a 37°, e trascorso questo tempo la cultura viene filtrata su candela, ed il liquido filtrato, in fialette chiuse alla lampada, viene conservato all'oscuro ed al fresco.

Le esperienze, come sempre, vengono eseguite sulle cavie, condizione indispensabile per poter avere come una unità di misura su cui

---

(1) Chantemesse. C. r. de la Soc. de Biologie. Gennaio 1897.
(2) Id. Atti del IX Congresso d'Igiene e Demografia. Madrid, 1898.

poter comparativamente, in fine, giudicare della efficacia dei vari metodi adoperati e seguendo l'abituale sistema tre cavie vengono iniettate sottocute con 4, 2, 1 cmc. di tossina. Le tre cavie restano tutte in vita fino al 10° giorno, nel quale periodo di tempo si è però osservato che ad un forte edema comparso già dopo 24 ore al punto di iniezione e riassorbitosi senza ulteriori conseguenze nell'ultima cavia, è susseguita necrosi e ulcerazione della cute nelle due prime. In tutte si è avuta cospicua ipertermia scomparsa però circa 48 ore dopo la iniezione della tossina. Al 10° giorno, quantunque la lesione cutanea delle due prime cavie non si fosse ancora riparata, eseguo l'iniezione di prova nel cavo peritoneale degli animali trattati, avendone l'esito qui appresso segnato:

TABELLA VI.

Cavie	Peso delle cavie	Quantità di tossina iniettata — Cmc.	Reazione locale	Temperatura rettale dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata dopo dieci giorni — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª	Circa 250 gr. ciascuna.	4	Edema, escara	41°.5	0.55 %	—	D. M. L. della brodocultura di prova = 0.45 %.
» 2ª		2	Id.	40°.8	»	—	
» 3ª		1	Edema soltanto	40°.8	»	+	
Controllo	..	..	..	..	»	+	

Un'altra esperienza ho eseguito per constatare la eventuale *azione adiuvante* della tossina, limitandomi [ad inoculare due cavie nel cavo peritoneale con $^{1}/_{10}$ della D. M. L. di brodo-cultura, e iniettandole quindi il giorno appresso una con 6 e l'altra con 2 cmc. di tossina sottocute. Le due cavie restano in vita. Tenuto poi conto dei risultati avuti e per cui lo stato immune desiderato viene conferito è vero dalla tossina in esame, ma a prezzo però di lesioni locali veramente impressionanti, poichè male si presterebbe ad essere adoperato in pratica un vaccino dotato di così spiccata azione necrotica sui tessuti, ho arrestato a questo punto le mie indagini, passando ad eseguire altre esperienze.

Vaccinazioni con la tossina di Werner. — Recentemente i coniugi Werner (1) facevano alla Società di biologia una comunicazione di alta

(1) C. r. de la Société de Biologie, sed. del 28 maggio 1904.

importanza pratica e scientifica, e cioè che si può avere dalle culture su mezzi liquidi del bacillo del tifo una tossina attivissima, o almeno la più attiva fra le varie tossine più o meno discutibili che fino ad oggi è stato possibile di ottenere. Questi due ricercatori sono di opinione che la tossina specifica non viene secreta dal germe nei comuni terreni di nutrizione; essa però sarebbe un costituente così labile e caduco del corpo batterico che se il bacillo specifico viene coltivato in largo contatto dell'aria per tre giorni in acqua peptonata a 37°, e quindi travasata la cultura in recipienti chiusi alla lampada vengono questi tenuti per uno o due giorni a 25°, basta questo semplice trattamento perchè la tossina passi nel liquido, dove è dimostrabile previa filtrazione. Così facendo i due autori hanno potuto avere un filtrato tossico per la cavia alla dose di ⅓ di cmc. %, e tossico per il coniglio alla dose di 0.1 cmc. %.

Io mi sono preparato una certa quantità di questa tossina, innestando un campione di tifo virulento (D. M. L. = 0.30 %) in acqua peptonata allestita secondo Koch, e posta in un matraccio di Fernbach. La cultura fu tenuta in incubazione per 3 giorni a 37°, durante il quale tempo venne attivamente aerata mediante il dispositivo adottato da Roux e Yersin per la preparazione della tossina difterica: all'orificio del collo del matraccio venne, cioè adottato ad disopra del tampone di ovatta un tappo di gomma munito di un tubo di vetro comunicante a mezzo di un tubo di innesto con un gorgogliatore preparato con soluzione di potassa caustica; l'appendice laterale del pallone fu rilegata ad una pompa ad acqua che operava l'aspirazione. La cultura così ottenuta fu in seguito sottoposta al procedimento consigliato dagli autori e da ultimo filtrata su filtro di porcellana. Col filtrato inoculai quattro cavie sottocutaneamente, usando dosi progressivamente decrescenti, e quindi dopo 6 giorni, scomparsa ogni traccia di reazione locale — limitatasi del resto ad un po' di edema — tutte vennero assoggettate alla iniezione della cultura di prova nel cavo peritoneale assieme ad un controllo.

I risultati avuti dalla esperienza fatta con questa tossina sono riassunti nella seguente tabella:

TABELLA VII.

Cavie	Peso delle cavie	Quantità di tossina iniettata — Cmc.	Reazione locale	Temperatura rettale dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata dopo sei giorni — Cmc.	Esito	Osservazioni
Cavia 1ª	Circa 300 gr. ciascuna.	6	Lieve edema riassorbitosi senza dar luogo a escara.	39°. 1	0 35 °/₀	+	La D. M. L. della brodo-cultura di prova, iniettata nel peritoneo, corrisponde a cmc. 0 30 °/₀.
» 2ª		4		38°. 5	»	+	
» 3ª		2		38°. 3	»	+	
» 4ª		1	Assenza di edema	38°. 4	»	+	
Controllo		..	..	..	»	+	

Con un tale esito, ogni ulteriore ricerca mi è parsa superflua; dirò soltanto che avendo già in precedenza eseguita qualche esperienza tendente a mettere in rilievo l'eventuale *potere adiuvante* di questa *tossina*, questa esperienza ha dato dei risultati negativi. Fissata a cmc. 0.30 % la dose minima letale delle brodo-culture del campione di tifo adoperato, due cavie vengono iniettate nel cavo peritoneale ciascuna con cmc. 0.25 % di brodo-cultura, e di esse ad una contemporaneamente, e all'altra il giorno appresso, si inietta per via sottocutanea 4 cmc. del filtrato in esame: le due cavie sopravviyono.

Vaccinazione con la tossina di Rodet, Lagriffoul e Walhy (1). — Il Rodet, insieme ai due ora citati autori, pochi giorni prima dei Werner, alla stessa Società di biologia, ritornando sulla quistione della tossina solubile del tifo, comunicava i risultati di nuove ricerche dalle quali torna ad essere messa in luce la scarsa tossicità dei filtrati delle brodo-culture, d'accordo in ciò con quello che sei anni prima il Rodet

(1) C. r. d. la Soc. de Biol., seduta del 14 maggio 1904.

aveva notato e in perfetto disaccordo con quanto hanno creduto di osservare i Werner. E la contradizione è tanto più notevole in quanto che il procedimento di cultura adottato da Rodet, Lagriffoul e Walhy è, se non identico, certo molto affine a quello adoperato, e già descritto, dai Werner.

I primi, difatti, come questi ultimi, consigliano di adoperare culture di tre giorni, ottenute a 37° e fortemente aerate; la differenza sta solo nel fatto che adoperano il brodo invece dell'acqua peptonata, e che tralasciano di abbandonare per due giorni a 25° in palloni chiusi le culture, differenza di poco rilievo quando si pensa come ben limitati dovessero essere gli effetti dell'autolisi batterica in simili condizioni, e come i Werner più che altro nel loro filtrato altro non potevano riscontrare che quel tanto e solo quelli dei prodotti attivi dei germi secreti nel mezzo liquido nutritivo. Ora, seguendo questo metodo, Rodet e i suoi collaboratori hanno ottenuto un filtrato debolmente tossico, il quale uccide la cavia per via intraperitoneale alla dose di cmc. 4 %, ed il coniglio alla dose di cmc. 1 % per via endovenosa.

Io, adoperando come terreno di cultura il comune brodo nutritivo disposto in un pallone di Fernbach in uno strato di circa 2 cmc., adottando per aerare la cultura lo stesso procedimento avanti descritto, trascorsi i tre giorni di incubazione consigliati dagli autori, filtro su candela Chamberland e conservo il filtrato in boccette chiuse alla lampada, all'oscuro e in luogo fresco.

Con questo filtrato, puramente allo scopo di dosarne la tossicità, feci iniezioni a tre cavie nel cavo peritoneale iniettandone a ciascuna rispettivamente cmc. 4, 2, 1 %. Gli animali furono tenuti in osservazione per 6 giorni consecutivi, durante i quali non mi fu dato nè vederne morire alcuno, nè constatare in essi forti diminuzioni di peso o cospicue elevazioni di temperatura. Dopo questo tempo, visto che tutte e tre le cavie mostravano di non avere risentito gran danno dalla iniezione del filtrato, furono iniettate nel cavo peritoneale con brodocultura di tifo assieme ad un controllo; dopo 24 ore il controllo era morto, sopravvivevano invece le tre cavie precedentemente trattate con la tossina di Rodet. L'esperienza è ordinata nella seguente tabella:

TABELLA VIII.

	Peso delle cavie — Gm.	Quantità di tossina iniettata nel peritoneo — Cmc.	Peso dopo 2 giorni — Gm.	Peso dopo 4 giorni — Gm.	Peso dopo 6 giorni — Gm.	Temperatura dopo 48 ore	Quantità di cultura iniettata nel peritoneo dopo 6 giorni — Cmc.	Esito	Osservazioni
Cavia 1ª	315	4 %	290	300	320	39.7	0.95	—	Il controllo è stato iniettato con 0.25% della brodo-cultura di prova; le cavie trattate con 0,30%.
» 2ª	290	2 %	275	295	300	39.2	0.90	—	
» 3ª	300	1 %	300	290	300	38.9	0.90	—	
Controllo	320	..	..	..	..	..	0.80	+	

Il risultato veramente seducente della esperienza ha però il suo lato debole — lato d'altro canto di essenziale importanza — nel fatto che tanto il liquido supposto vaccinante, quanto la cultura di prova sono state entrambi introdotti nell'organismo della cavia per la medesima via del peritoneo. Ora, indipendentemente dalla natura specifica del materiale iniettato nel peritoneo prima della infezione, si può conferire all'animale così trattato una resistenza alla infezione che tuttavia non sapremmo mettere in rapporto alla specifica immunità acquisita contro la infezione medesima.

Issaeff (1) difatti vedeva che se ad una cavia si inietta nel peritoneo 1 cmc. di urina, o di soluzione fisiologica di cloruro sodico, ½ o anche $^1/_{11}$ di cmc. di brodo nutritivo ordinario, 1 cmc. di soluzione acquosa al 2 % di acido nucleinico, ¼ o $^1/_{10}$ di cmc. di tubercolina; se si fa succedere a 24 ore di distanza a questa iniezione l' infezione anch'essa per via intraperitoneale con una quantità mortale di colera-cultura, la cavia sopravvive. Pfeiffer interpreta questo fenomeno come un caso di pseudo-immunità, e Metchnikoff lo attribuisce al fatto che il periodo di *leucopenia* (Duhram) o di *fagolisi* che succede alla iniezione della cultura, per la iniezione diciamo preparatoria, viene soppresso non solo ma sostituito da uno stato di iperleucocitosi in sito. In ogni modo sia quale si voglia la sua spiegazione, il fatto esiste, ed io non avrei eseguito la esperienza precedente se non avessi avuto sotto mano, con le cavie sopravvissute alla iniezione del filtrato e che dovevano servirmi a stabilire il valore tossico di questo liquido, se non avessi avuto dico sotto mano un materiale di osservazione che ho creduto utile di non sprecare.

---

(1) Zeitsc. f. Hyg., vol. XVI, 1904, pag. 298.

E, concordemente difatti a questo già previsto errore, a risultati ben differenti porta l'esperimento eseguito praticando nel peritoneo la iniezione infettante, e sottocute la iniezione del liquido in esame.

Sei cavie furono iniettate sottocute con 6, 4, 2 cmc. di filtrato; si ha lieve edema al punto di innesto, edema che si riduce prestamente e scomparisce in 3ª-4ª giornata senza dar luogo a processi necrotici della cute, e una modica elevazione di temperatura solo n qualcuna delle cavie. Di queste sei cavie, una metà vengono infettate 5 giorni dopo la iniezione della tossina in esame, e l'altra metà, onde eliminare ogni dubbio che la causa dell'esito negativo avuto nel primo saggio dipendesse dal *periodo di reazione* non lasciato sufficientemente protrarre, subisce la stessa iniezione infettante solo al 15° giorno. L'esito però è stato completamente negativo, ed io lo riferisco nei suoi particolari nella seguente tabella :

TABELLA IX.

	Peso delle cavie	Quantità di tossina iniettata sottocute — Cmc.	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata — Cmc.	Tempo decorso fra la vaccinazione e la infezione	Esito	Osservazioni
Cavia 1ª.	Circa 300 gm. ciascuna	6	Lieve edema riassorbitosi senza ulcerazione della cute.	39.0	0.45 %	5 giorni	+	D. M. L. della cultura di prova adoperata = cmc. 0.35%.
» 2ª.		4		39.0	»	»	+	
» 3ª.		2	Assenza di edema .	38.6	»	»	+	
(1° controllo) cavia 4ª . . .		..	..	..	»	..	+	
Cavia 5ª.		6	Come le cavie 1ª e 2ª	39.2	0.50 %	15 giorni	+	D. M. L. della cultura di prova adoperata = cmc. 0.40%.
» 6ª.		4		38.7	»	»	+	
» 7ª.		2	Edema appena sensibile.	38.5	»	»	+	
(2° controllo) cavia 8ª . . .		..	..	..	»	..	+	

Resta quindi assodato, contrariamente a quello che per la iniezione del filtrato nel peritoneo era stato osservato, che una unica iniezione sottocutanea di questo liquido anche in quantità di 6 cmc. (quantità maggiori non sono state adoperate per evitare i disturbi nutritivi dei tessuti sottoposti ad una forte distensione) non è sufficiente a conferire alla cavia la immunità contro la infezione specifica corrispondente. Risultati però molto più soddisfacenti si hanno se invece di una sola iniezione del filtrato in esame, si pratica alla cavia in esperimento, alcuni giorni dopo la prima, una seconda iniezione.

Quattro cavie sono state iniettate sottocute con l' 1 % di filtrato, e 6 giorni appresso, tutte vengono reinoculate con lo stesso liquido in quantità di cmc. 2 % ; le quattro cavie preparate, a diverso periodo di tempo infettate per la via del peritoneo con una dose sicuramente mortale di brodo-cultura, si sono comportate nella maniera seguente :

TABELLA X.

	Peso delle cavie — Gm.	Quantità di vaccino iniettato 1ª iniezione — Cmc.	2ª iniezione — Cmc.	Tempo decorso fra la 2ª iniezione di vaccino e la infezione	Quantità di cultura iniettata nel peritoneo — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª	350	3. 50	7	7 giorni	0. 40 %	—	La quantità di cultura iniettata nel peritoneo delle cavie in esame è superiore di $^1/_3$ alla dose minima letale.
» 2ª	300	3. 00	6	15 »	0. 40 %	—	
» 3ª	335	3. 50	7	28 »	0. 35 %	+	
» 4ª	340	3. 50	7	30 »	0. 40 %	+	

Ne consegue che con il filtrato di cultura di tifo preparata secondo Rodet, Lagriffoul e Walhy, se non è possibile vaccinare le cavie contro la infezione tifosa a mezzo di una unica iniezione, questo effetto invece si può raggiungere facendo seguire alla prima una seconda iniezione. Lo stato immune, però, così conseguito, è poco durevole, dovendosi esso ritenere certamente scomparso dopo un periodo di tempo che sta fra i 15 e i 28 giorni dall' ultima iniezione vaccinante.

Un' ultima esperienza ho eseguito, in fine, in rapporto all'*azione adiuvante* di questa tossina : due cavie infettate con una dose di brodo-tifo-cultura di poco inferiore alla minima letale sono state il giorno

appresso iniettate sotto-cute rispettivamente con 8 e 4 cmc. di tossina sottocute; di esse muore la prima per confermata setticemia eberthiana, l'altra sopravvive, ciò che ci dice come, entro certi limiti, la iniezione, del filtrato in esame è al caso di risvegliare non solo, ma di rendere anche mortale, un processo infettivo specifico sopito e che, abbandonato a se stesso, sarebbe anche stato definitivamente vinto.

Vaccinazioni con essudato peritoneale di cavie infette di tifo, filtrato. — L' impiego dell'essudato di animali infetti, come mezzo di immunizzazione specifica di altri animali non è un fatto nuovo, in quanto che già nel 1898 Wernicke (1) si serviva dell'essudato pleurico di cavie infette di peste a scopo di immunizzazione e col deliberato proposito di ottenere un siero squisitamente antitossico, e Terni e Bandi (2) si servivano più tardi dello essudato peritoneale di cavie infettate con una emulsione in brodo di Löffler di bacilli della peste, per difendere l'uomo contro la medesima infezione. Il Bail (3) a mezzo dell' essudato peritoneale di cavie infette di tifo, inoculava degli animali dai quali otteneva un siero dosato di proprietà agglutinanti specifiche, e forse anche specificamente precipitante (Lentz). Mi spingeva però ad eseguire queste esperienze oltre, che i ricordati esempi di utile impiego dell'essudato pleurico e peritoneale nella immunizzazione e nella profilassi delle infezioni, anche e sopratutto il desiderio di risolvere un quesito che già fin dai primi tempi in cui ho cominciato a studiare l'argomento della immunità nel tifo si è sempre affacciato con insistenza alla mia mente, e che cioè solo allora potremo avere un solido punto di partenza in questo genere di ricerche quando saremo riusciti a sbarazzarci dei mezzi nutritivi più o meno artificiali per studiare invece, ed ottenere in uno stato di relativa purezza, i prodotti del ricambio del germe sviluppatosi nel suo naturale ambiente, o almeno in un ambiente a questo il più possibilmente affine. Io dovrò più avanti ritornare su questo argomento esponendo in riassunto i risultati da me avuti nelle vaccinazioni a mezzo della nucleo-albumina del tifo, ma mi piace fin da ora dire se che col procedimento di estrazione delle tifo-culture da me adottato sono intanto riuscito ad avere nella nucleo-albumina un prodotto tossico, che per il suo comportamento e il suo potere di resistenza al calore più si avvicina al tipo della *aptina tossica* di Ehrlich, scostandosi invece da tutti quei prodotti tossici fino ad ora dallo stesso germe ottenuti, e che per la capacità di resistere in soluzione a temperature di 100 e più gradi lasciano facilmente intendere trattarsi qui piuttosto di tossoidi o di altri veleni secondari in genere, ad onta di ciò, dico, io non sono mai stato contento dei risultati da me stesso avuti; è anzi mia opinione che pur essendomi avvicinato di molto al vero con la coltivazione del bacillo in brodo e sangue, la nucleo- albumina ottenuta da

---

(1) *Sitzungsber d. Gesellsch. z. Beförderung d. gesam. Naturwissensch. z. Marburg*, 1898.
(2) Revue d' Hygiène, 1900.
(3) Prager medic. Wochens., 1901, n. 7 e 12.

queste culture contiene sì la tossina che in questo terreno nutritivo il germe è capace di elaborare, ma pur avendo essa caratteri biologici tali da fare pensare ad una grande affinità con la tossina dal germe elaborato *in vivo*, è mio pensiero, dico, che essa con quest'ultima non possa essere identificata.

Ora, pure prescindendo da ogni giudizio d'altronde ancora arbitrario per classificare la tossina del tifo fra le tossine schiette, o fra le endotossine, noi non possiamo misconoscere — oramai l'accordo è generale su questo punto — che allo indiscutibile potere di riproduzione del germe nell'organismo infetto, strettamente si lega la produzione di un veleno specifico al quale sono dovute e le perturbazioni dello stato di salute, e la morte degli attaccati. Magari, senza perciò discostarci dall'unico criterio fondamentale che possediamo in proposito e che ravvicina le tossine agli enzimi, potremo credere che avvenga per il tifo quello che avviene per certi fermenti capaci di secernere in piccole quantità delle diastasi, e di tenere intimamente legati alla cellula viva tutta una serie di altri enzimi come l' invertasi, la maltasi, ecc. (1) ; ma una volta distrutta naturalmente o artificialmente l'integra compagine del protoplasma cellulare, questi enzimi si mettono in libertà, e noi dovremmo quindi trovare, o avremmo almeno grande presunzione di trovare, nei liquidi organici dell'animale infetto quei prodotti tossici specifici che o per secrezione o per disfacimento del corpo cellulare dalla cellula-tifo, si sono liberati e che avvelenano l'organismo ; e trovava difatti il Wernicke nelle sue esperienze ora ricordate, che l'essudato pleurico di una cavia pestosa era capace di uccidere i topi in poche ore alla dose di 1 cmc.

La ricerca mi è parsa quindi non solo giustificata, ma indispensabile, ed ho diviso quindi il mio compito nell'assodare prima se una tossina specifica era possibile dimostrare in questa specie di cultura *in vivo* del bacillo del tifo, e di stabilire quindi del liquido in esame il potere vaccinante.

In quanto alla prima parte precedono a queste mie osservazioni quelle di Rodet e Guéchoff (2), dei quali due autori, il primo, già fino dal 1898 (3) dichiarava che ben differente da quella avuta per filtrazione dalla brodo-cultura, doveva essere la tossina elaborata *in vivo* dal bacillo del tifo, e cercava quindi ora assieme al Guéchoff di dare al quesito una soluzione seguendo il metodo dei sacchi di collodion introdotti nel peritoneo delle cavie, metodo che tanto felici risultati aveva dato per il colera a Metchinikoff, Roux e Salimbeni (4). I risultati però avuti dal Rodet e Guéchoff furono negativi, ed essi attribuiscono l' insuccesso non ad una mancata secrezione di tossina da parte del bacillo del tifo nel peritoneo

---

(1) Oppenheimer, *Die Fermente u. ihre Wirk.* Leipzig, 1903.
(2) C. r. d. la Soc. de Biol., 1900, p. 965.
(3) C. r. d. la Soc. de Biol., 1898, p. 756.
(4) An. d. l' Institut Pasteur, 1896, p. 257.

della cavia, ma al fatto che la tossina tifosa la quale è diffusibile attraverso la pergamena, non lo è invece attraverso il collodion.

In conseguenza, senza ripetere le esperienze di Rodet e Guéchoff, ho adoperato come materiale di studio senz'altro l'essudato peritoneale di cavie morte per infezione da bacillo di Ebert, diluendo questo materiale in brodo e filtrandolo quindi alla candela.

In ciò fare sono stato guidato dalle seguenti ragioni:

Si è visto spesso, dai precedenti ricercatori, addebitare alla *tossina solubile del tifo*, gli effetti tossici e immunizzanti ottenuti con brodo-colture sterilizzate di bacillo del tifo, adoperando impropriamente un termine che dovrebbe solo servire a indicare i prodotti tossici esistenti nel liquido culturale, indipendentemente da quello che di velenoso possono ancora contenere, come lo contengono di fatti, i corpi batterici. Allo scopo quindi di vedere se nell' essudato peritoneale esistesse una tossina libera dagli elementi cellulari batterici, era necessario separare il liquido dalla parte corpuscolare a mezzo della filtrazione, separazione a cui va anche annesso un altro importante ufficio, quello di escludere dal liquido da iniettare i corpi dei leucociti che in quantità maggiore o minore popolano l'essudato. E dico importante ufficio in quanto che dovendo servire il liquido in esame a stabilire come prima tappa dell' esperimento se in esso fosse o meno contenuta una tossina, e se questa fosse capace di dare luogo a fenomeni di immunità, non poteva essere senza dannose conseguenze l'iniezione negli animali sieriferi assieme ai prodotti del ricambio dei germi, anche la introduzione dei corpi dei leucociti per i quali ultimi si sarebbe man mano venuto elevando il potere antileucocitario del siero di questi animali con grave scapito sia del suo potere battericida e antimicrobico [Besredka (1)] come forse ancora, data l' importanza dei fagociti nella difesa dell' organismo contro la stessa tossina difterica [Cappellani (2)], del suo eventuale potere antitossico. Per la stessa ragione ho poi addizionato l' essudato peritoneale con comune brodo nutritivo prima della filtrazione, ed ho rapidamente proceduto alla medesima nello intento di evitare la coagulazione del liquido, riducendo al minimo possibile il colliquamento dei leucociti e la quantità quindi dei loro prodotti di disfacimento mescolati al supposto liquido tossico batterico.

Ho cominciato col ricercare se esista una sostanza tossica solubile nell'essudato peritoneale, e a tale scopo infettate alcune cavie, con la iniezione nel cavo peritoneale di agar-cultura di tifo emulsionata in soluzione fisiologica, avvenuta la morte infra le 24 ore, ho pipettato il liquido contenuto nel peritoneo versandolo in grosse provette contenenti quantità note di comune brodo nutritivo, in modo da avere una

(1) An. d. l' Ins. Pasteur, 1901, p. 301.
(2) Riforma medica, 1904, n. 31.

parte di essudato diluito in tre di brodo; agito in modo da avere una mescolanza perfetta e metto subito a filtrare su candela di porcellana. Il filtrato viene iniettato nel cavo peritoneale a quattro cavie in proporzioni decrescenti dal 3 al ½ %, e di questi animali tenuti in osservazione per un periodo di tempo di otto giorni, ne muoiono due e due sopravvivono, e, fatto strano, muoiono proprio le cavie iniettate con una minore quantità di filtrato, per come appare dalla seguente tabella:

TABELLA XI.

	Peso delle cavie — Gm.	Quantità di filtrato iniettato — Cmc.	Esito	Titolo della diluizione dello essudato peritoneale	*Osservazioni*
Cavia 1ª. .	300	9.00 (3 %)	—	1:4	La D. M. L. della brodocultura corrispondente alle culture in agar con cui sono state infettate le cavie servite alla preparazione dell'essudato, è uguale a cmc. 0 40 % (cavie per iniezione endoperitoneale).
» 2ª. .	340	6.8 (2 %)	—	..	
» 3ª. .	325	3.25 (1 %)	+ (in 48 ore)	..	
» 4ª. .	310	1.55 (½ %)	+ (in 72 ore)	..	

Di fronte ad un fatto così paradossale, e che non ha riscontro in nessuno dei veleni di ogni natura a noi conosciuti, io mi sento in dovere di riferire qui senza nè selezioni nè critiche tutte quante le esperienze di riprova da me eseguite al proposito, esperienze che tanto più mi si imponevano in quanto che per le prove culturali eseguite con materiale prelevato dagli organi interni e dal sangue delle cavie morte nella esperienza ora riferita, mi son potuto assicurare che era da escludersi ogni sospetto di intervenuta infezione.

Per brevità, e per maggiore chiarezza, riassumo nella seguente tabella le ricerche a tale proposito eseguite.

TABELLA XII.

		Peso degli animali adoperati — Gm.	Quantità di filtrato iniettato — Cmc.	Sito della iniezione	Virulenza della cultura iniettata — Cmc.	Titolo della diluizione	Esito	*Osservazioni*
1ª esperienza	1ª cavia	275	3 %	peritoneo	0.40 %	1 : 3	—	1° Nella 4ª finca di questa tabella le cifre segnate indicano la dose minima letale della brodo-cultura con cui furono allestite le culture su agar destinate ad infettare le cavie.
	2ª »	300	2 %	id.	»	»	—	
	3ª »	310	1 %	id	»	»	—	
	4ª »	260	0.1 %	id.	»	»	+ (dopo 4 giorni)	
2ª esperienza	1° topo b.	45	2	id.	0.35 %	1 : 5	—	
	2° »	30	2	id.	»	»	+ (in 48 ore)	
	3° »	40	0.5	id.	»	»	+ (in 48 ore)	
3ª esperienza	1ª cavia	300	2 %	sottocute	»	1 : 4	—	
	2ª »	320	1 %	id.	»	»	—	
	3ª »	290	0.5 %	id.	»	»	—	

Anche in questo caso gl'innesti fatti nei comuni terreni nutritivi dagli organi interni e dal sangue degli animali morti dopo la iniezione del filtrato sono rimasti indefinitamente sterili, ciò che assieme alla costatazione dell'assenza di qualsiasi forma batterica nei preparati colorati allestiti per strisciamento con sangue e con polpa splenica, permette di confermare che i casi di morte osservati se non sono stati accidentali, certo non si possono attribuire — come nella esperienza precedente — all'azione di un qualsiasi agente infettante. Ond'è che sembra potersi dire che nell'essudato peritoneale di cavie morte per infezione da bacillo di Eberth esiste in soluzione una sostanza tossica, indipendente dai corpi batterici, alla quale sono sensibili le cavie e i topi bianchi, più attiva se iniettata nel peritoneo, meno se iniettata sotto-cute. In quanto poi alla proprietà del filtrato di mostrarsi attivo più in piccole che in grandi quantità, io non saprei, allo stato attuale di questo abbozzo di ricerche, dire se questa sia una proprietà inerente alla sostanza tossica tifosa nel liquido contenuta, o se gran parte del fenomeno non sia piuttosto rappresentato dall'azione ostacolante che qualcuna delle sostanze contenute nel liquido di diluizione, come il cloruro di sodio ad esempio (1), viene ad esercitare sull'effetto tossico della prima.

Ad ogni modo, senza insistere più oltre su questo lato della questione, dirò che con questo essudato filtrato ho proceduto ad esperienze di immunizzazione su di un coniglio. L'immunizzazione di questo animale è proceduta di pari passo con la immunizzazione di un'altro coniglio, eseguita a mezzo di brodoculture sterilizzate.

Il trattamento del primo coniglio (*A*) è durato un mese, nel quale tempo esso ha ricevuto per iniezione endovenosa in dosi crescenti 29 cmc. di filtrato, sempre fresco, ottenuto ogni volta diluendo in proporzione di 1:5 l'essudato peritoneale di cavie infettate con una cultura di un campione di tifo mantenuto ad una virulenza quasi costante (D. M. L. per le brodo-colture su cavie = 0.40 % circa); nello stesso tempo l'altro coniglio (*B*) ha ricevuto, anch'esso per iniezioni endovenose, 32 cmc. di brodo-culture sterilizzate a 60° iniettate volta per volta in quantità di 2 (prima iniezione) a 10 cmc. (ultima iniezione). Dieci giorni dopo l'ultima iniezione i due conigli sono stati svenati, e raccolto il sangue e separatone il siero di questo ho studiato il potere agglutinante, il battericida, il potere preventivo specifico, ottenendo i risultati che elenco nelle seguenti tabelle:

---

(1) Bonome osserva che il cloruro di sodio può ostacolare l'azione deleteria speciale di alcune sostanze tossiche.

TABELLA XIII. — *Titolo del potere agglutinante del siero.*

	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1500	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000
Coniglio *A* .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Id. *B* .	+	+	+	+	+	+	—	—	—	–

NB. Il dosaggio del potere agglutinante del siero è stato eseguito su agar-culture di 24 ore, emulsionate in soluzione fis. di cloruro sodico; i singoli saggi venivano lasciati per 2 ore a 37°, e quindi esaminati al microscopio; e come termine limite ho adottato il criterio di ritenere ancora positiva la reazione quando l'esame in goccia pendente lasciava scorgere ammassi di non meno di quattro germi.

TABELLA XIV. — *Siero adoperato in cmc.*

	Potere battericida				Potere preventivo			
	0.10	0.01	0.001	0.0001	0.50	0.10	0.05	0.01
Coniglio *A* . .	sopravvive	sopravvive	sopravvive	morto	sopravvive	sopravvive	morto	morto
Id. *B* . .	id.	id.	morto	id.	id.	morto	id.	id.

NB. Le prove sono state eseguite su cavie di 300 gr., e la cultura di prova iniettata nel loro cavo peritoneale è stata sempre una brodo-cultura di 24 ore, di cui si può più agevolmente e sicuramente iniettare una quantità costante e determinata, che nel caso presente è stata di $^1/_4$ superiore alla D. M. L. — Le ricerche per il dosaggio del potere battericida del siero sono state eseguite col metodo Pfeiffer, quelle per il potere preventivo iniettando, 24 ore prima della infezione, la quantità voluta di siero sottocute.

Col siero, poi, del coniglio *A*, nell'intento di vedere se la introduzione di questa sostanza tossica nell'organismo del coniglio dà luogo alla produzione di sostanze antagoniste, e se quindi a tale sostanza tossica sciolta nell'essudato peritoneale spetti veramente il nome di tossina (aptina tossica), ho eseguito la seguente esperienza:

Otto cavie di circa 250 gm. ciascuna sono divise in due lotti di quattro cavie ciascuno; a quattro di esse inietto nel peritoneo rispet-

tivamente 3, 2, 1, ½ cmc. di essudato peritoneale diluito in brodo e filtrato (D. M. L. della brodo-cultura corrispondente alla cultura infettante = cmc. 0.35 %; titolo della diluizione 1 : 5), e alle altre quattro cavie in pari tempo iniettto nel peritoneo le stesse quantità di filtrato addizzionata ciascuna di ½ cmc. del siero in esame. L'esito avuto è stato il seguente:

TABELLA XV.

	Peso delle cavie	Quantità di filtrato in cmc.	Quantità di siero in cmc.	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia	Circa 250 grammi ciascuna.	3	..	sopravvive	Gli animali sono stati tenuti in osservazione per sei giorni di seguito; la morte delle cavie 3ª e 4ª si è avuta fra il secondo e il terzo giorno dalla iniezione.
2ª »		2	..	id.	
3ª »		1	..	morta	
4ª »		0. 5	..	id.	
5ª »		3	0. 5	sopravvive	
6ª »		2	»	id.	
7ª »		1	»	id.	
8ª »		0. 5	»	id.	

Per quanto, adunque, lo speciale comportamento di questo filtrato che di fronte agli animali da esperimento si comporta in una maniera tanto differente dai conosciuti prodotti tossici batterici, male si presti a più esatte determinazioni, si può tuttavia, in base all'esito avuto dalla esperienza precedente, dire che « la sostanza tossica solubile contenuta nell'essudato peritoneale di cavie infette di tifo, per avere come tutte le aptine la proprietà di dar luogo alla produzione di un'antisostanza specifica, può essere ritenuta come una speciale tossina schietta ».

Assodato questo punto della ricerca, con questa tossina ho proceduto ad esperienze di immunizzazione rapida delle cavie, onde poterla paragonare in fine a tutti gli altri mezzi di vaccinazione antitifica che sono stati già studiati in precedenza, o che lo saranno appresso in questo lavoro.

Un primo esperimento è stato eseguito con essudato peritoneale di cavie infette con colture, di cui la D. M. L. della corrispondente

brodo-cultura era uguale a cmc. 0.35 %, diluito in brodo in proporzione di 1:4. Tre cavie sono state iniettate sottocute, con quantità decrescenti di questa tossina, e 10 giorni appresso sono state infettate per la via del peritoneo con una quantità mortale di tifo-brodo-cultura, assieme ad un controllo. L'esperienza è stata quindi ripetuta una seconda, ed una terza volta con filtrati avuti da essudati di cavie infette con un campione di tifo portato a diversa virulenza, e diluito in proporzioni differenti, ottenendo i risultati segnati nella seguente tabella:

TABELLA XVI.

		Peso delle cavie	Quantità di tossina iniettata — Cmc.	Reazione locale	Temperatura dopo 48 ore	Quantità di cultura iniettata dopo 10 giorni — Cmc.	Esito	D. M. L. cultura essudato — Cmc.	Titolo della diluizione dell'essudato
1° Esperimento	1ª cavia	Circa 300 grammi ciascuna	2.5	Edema scomparso in un periodo di tempo andato dal 3° al 7° giorno.	39°	0.50 %	+	0.35 %	1:4
	2ª »		0.5		39°.5	»	+	»	»
	3ª »		0.1		38°.7	»	—	»	»
Controllo	4ª »		..	..	..	»	+	»	»
2° Esperimento	5ª »		4	Edema riassorbitosi senza altre conseguenze in un tempo massimo di sei giorni.	39°.2	0.40 %	+	0.40 %	1:7
	6ª »		3		39°.2	»	+	»	»
	7ª »		2		39°.0	»	+	»	»
	8ª »		1		39°.5	»	+ (r.)	»	»
Controllo	9ª »		..	..	..	»	+	»	»
3° Esperimento	10ª »		2	Edema come sopra.	38°.7	0.45 %	+	0.20 %	1:5
	11ª »		1		39°	»	—	»	»
	12ª »		0.5		39°.2	»	—	»	»
	13ª »		0.1		38°.5	»	+	»	»
Controllo	14ª »		..	..	..	»	+	»	»

Noi possiamo pertanto a mezzo di questa tossina conferire alle cavie la immunità contro la infezione tifosa, cosa che però si può ottenere con una incertezza e una difficoltà di metodo, su cui dovrò ritornare nelle conclusioni generali di questa rivista, e per le quali — come dirò — male si presterebbe ad un largo impiego nella pratica delle vaccinazioni.

4. Esperienze di vaccinazione con estratti di brodo-culture in toto.

Le prime esperienze a questo proposito sono state fatte da Bitter (1) e ad esse ho già avanti accennato. Egli pigliando le mosse dagli esperimenti di immunizzazione antitifica eseguiti con culture vive da Beumer e Peiper e da Chantemesse e Widal, e dalle osservazioni di Sirotinin che sosteneva la incapacità del tifo-bacillo a moltiplicarsi nell'organismo infetto e che l'azione dannosa delle iniezioni di tifo-bacillo era da riportarsi sul conto dell'azione delle tossine liberatesi dai germi iniettati, vorrebbe che alla parola immunizzazione si sostituisse quella di abitudine al veleno (Giftgewöhnung), seguendo in ciò quello che già Flügge (2) aveva 4 anni avanti sostenuto. E con la intenzione di dare a questa maniera di vedere un sostegno sperimentale, poichè già Klikowicz nel 1888 aveva stabilito che l'iniezione di culture morte di tifo proteggeva contro la iniezione di culture vive, egli si limita a ricercare se la iniezione dei prodotti culturali del germe e quelli estraibili dal suo corpo medesimo sono capaci di conferire all'animale un aumento di resistenza, o l'insensibilità contro la azione di questo veleno così ottenuto. L'autore, modificando il metodo adoperato da Koch per la estrazione della sua tubercolina originaria, coltiva il bacillo del tifo in brodo addizionato del 5 % di glicerina per 14 giorni a 30° C., dopo il quale tempo aggiunge a due litri di questa cultura cmc. 50 di una emulsione di patine di tifo-culture su gelatina in soluzione fisiologica di cloruro sodico. La cultura viene concentrata nel vuoto a 30° C. fino al decimo del suo volume e quindi filtrata su candela, ottenendo così un liquido giallo-bruno, di cui 1 cmc. iniettato nelle vene ad un coniglio di gm. 1700 lo uccide, e il cui valore tossico è rimasto immodificato per parecchi mesi di seguito. Iniziati i suoi tentativi di immunizzazione con la iniezione di dosi progressivamente crescenti di filtrato, di 20 conigli trattati, solo 5 rimasero in vita; gli altri morirono per cachessia. Questi animali sopravvissuti tollerarono, poi, senza disturbo la iniezione di 1 cmc. di filtrato, dose mortale per dei controlli, e dettero un siero che mescolato a parti uguali col filtrato e iniettata quindi la mescolanza dopo 12 ore di contatto in quantità di 2 cmc. nelle vene dei conigli (= 1 cmc. di filtrato), questa mescolanza si mostrava inattiva

(1) Zeits. f. Hyg., vol. XII, p. 298, a. 1892.
(2) Ibid., vol. IV, p. 220.

mentre una miscela di siero normale e filtrato a parità di condizioni, infra 12-15 ore portava a morte i conigli di controllo. Da ciò, naturalmente, data la premessa di Sirotinin, poichè per tale via era giunto a rendere i suoi animali resistenti al veleno, l'A. li riteneva anche immunizzati contro la infezione, allargando ancora le sue speranze fino alla eventuale sieroterapia della malattia.

Ora senza dire che, anche rimanendo nel concetto di Sirotinin e di Bitter sulla patogenesi della infezione tifosa, il Bitter avrebbe, per asserire quello che asserisce, dovuto dimostrare la identità del veleno da lui adoperato con quello prodotto dal germe nell'organismo infetto, farò soltanto rilevare come il lungo periodo di tempo necessario allo stabilirsi di questa *abitudine al veleno* e la facilità con cui viene da questo trattamento fortemente danneggiato l'organismo animale siano state per me delle ragioni di tale valore da indurmi a non tentare delle esperienze di vaccinazione con questo liquido tossico.

Dopo il Bitter, Sanarelli (1) pubblicava le sue indagini sulla tossina del tifo e sulla immunità specifica con essa conferibile. L'autore dopo aver ricordato il lavoro di Brieger sulla tifotossina, da lui identificata ad una ptomaina, cita le osservazioni di Salkowsky (2), di Bouveret e Devic (3), i quali credono che la ptomaina isolata dal Brieger sia un prodotto di decomposizione ottenibile da qualunque sostanza albuminoide posta al calore in contatto con acido cloridrico; e per quanto queste osservazioni siano state combattute da Gautier (4), il quale crede che le ptomaine descritte da Brieger preesistano nelle culture di tifo senza per ciò costituirne la parte essenziale, resta per noi oggi di sicuro dimostrato che per la sua azione fisiologica, effettivamente, si discosta la tifotossina di Brieger da quello che si vede avvenire nella infezione tifosa e che effettivamente non si può riguardare questa sostanza come la tossina specifica del germe.

Il Sanarelli dice lo stesso per la tossialbumina di Brieger e Fränkel, e poichè l'impiego di procedimenti chimici più o meno complessi non può essere senza influenza sulla tossina cercata, così secondo lui « vale meglio, per il momento, attenersi allo studio della tossina tifica, così come la si trova nelle culture di bacillo di Eberth nei mezzi nutritivi ordinari ». E allo scopo di avere una tossina attiva, egli innesta, con una goccia di essudato peritoneale di cavia infettata con virus esaltato, dei palloni con brodo glicerinato al 2 %, e tiene questi palloni a 37° C. per un mese. Quindi li sterilizza e li lascia in riposo per 8 mesi alla temperatura ambiente, dopo di che, chiusi ermeticamente, sono posti a macerare per qualche giorno a 60° C. In seguito, si decanta il liquido limpido soprastante alle masse batteriche depositatesi al fondo dei recipienti, ottenendo così, come dice l'autore, un liquido tossico contenente non solo i prodotti di secrezione dei microbi, ma anche quelle sostanze che restano nei loro cadaveri e che la macerazione ne può estrarre; così egli ottiene un liquido tossico, di azione poco costante sui conigli, poco attivo sui topi bianchi, più attivo

---

(1) An. d. l'Ins. Pasteur, 1894, p. 194 e 353.
(2) Virchow's Arch., 1891, vol. 124°, p. 409.
(3) Revue de médec., 1892, nn. 1-2.
(4) *Toxines microbiennes et animales*. Parigi, 1896, p. 578.

invece sulle cavie e sulle scimmie, ed insiste sulle lesioni anatomiche intestinali, che in linea di massima si possono constatare negli animali intossicati, e sulla loro esatta corrispondenza con quanto è dato vedere nello infezione eberthiana dell'uomo, per assegnare alla sua tossina evidenti caratteri di specificità. Ora per ciò che riguarda la natura di questa tossina nota il Gautier (1), che quella preparata dal Sanarelli non si potrebbe considerare che come una mescolanza assai complessa di diverse sostanze inerti e banali con parecchi veleni prodotti dal germe specifico durante la vita, o usciti dal suo cadavere dopo la morte, e oggi, a 8 anni di distanza in linea generale non si può che sottoscrivere alle idee di Gautier. Io, non perchè il fatto sia per intero applicabile al caso della tossina di Sanarelli e con essa a tutti i liquidi tossici ricavati da vecchie culture, ma perchè possano essere messe in risalto certe eventuali analogie, ricorderò innanzi tutto gli studi dell'Ehrlich (2) e del Madsen (3) sulla costituzione della tossina difterica, per cui resta assodato che mano mano che la tossina invecchia se ne modificano i costituenti in modo che dalla prima modificazione dei tre componenti la tossina vera (proto, deutero-, tritotossina), che con la perdita dei gruppi tossofori porta alla produzione dei sintossoidi e alla comparsa dello spettro dello stadio di emitossina, si va sino alla scomparsa della β-prototossina e alla rimanenza solo di β-deuterotossina e di piccole tracce di β-tritotossina, in cui ogni ulteriore decomposizione si arresta e rimane in questa forma il veleno per lungo tempo immodificato. A questo si aggiunga ancora che il processo di dissoluzione che si compie nelle vecchie culture, la modificata reazione del mezzo liquido nutritivo, non possono essere ritenuti senza conseguenza sulla composizione della tossina, in quanto che vengono man mano producendosi delle combinazioni ammoniacali, ed altri prodotti chimici i quali agiscono modificando e decomponendo i veleni batterici. Le culture in brodo di bacillo difterico dànno dei filtrati la cui tossicità può essere rappresentata da una doppia linea, da una parabola cioè su cui decorre, per dir così, la tossicità dovuta ai costituenti della tossina vera, tossicità che in progresso di tempo raggiunto un massimo va mano mano abbassandosi, e da un'altra linea ascendente su cui decorre il tossone della tossina totale, il quale va aumentando di valore, cioè di quantità, mano mano che la cultura invecchia e che si diffondono nel liquido i prodotti di disfacimento dei corpi batterici; tossone che con l'azione specifica del veleno bacillare non ha niente che vedere in quanto che non è improbabile che debba esso andare identificato a quella pseudo-nucleina che ho potuto ottenere da una quantità di filtrati di brodo-culture di germi patogeni e non patogeni (4) e a cui va negato ogni carattere di specificità. Così avverrebbe anche per il tifo, per tacere di altri germi supposti produttori di endotossine, che invecchiando le culture, la tossicità del liquido aumenta è vero, ma aumenta per i veleni secondari che si vanno grado grado formando, mentre la tos-

---

(1) L. c.

(2) Klin. Jahrb., vol. VI, p. 299, 1899, e Deut. med. Wochens., 1898, p. 597.

(3) An. d. l'Ins. Pasteur, 1899, p. 568.

(4) A. PALADINO-BLANDINI. Questi Annali, 1904.

sina si trasforma in tossoide; prodotti che ci spiegano il perchè, contrariamente a quello che sappiamo sul riguardo della tossina difterica e della tetanica e degli enzimi in genere a cui pare si debbano rallegare queste sostanze tossiche specifiche, ci spiegano, dico, il perchè in questi casi noi ci troviamo sotto mano dei liquidi tossici solidamente resistenti e al calore, e all'azione della luce, e a quella dell'ossigeno atmosferico; prodotti secondari, aggiungo io ancora, fra cui grande ufficio è riserbato alle pseudonucleine sopra ricordate, che come le nucleine vere hanno potere cumulativo allorchè vengono iniettate nell'organismo animale, alla quale proprietà non mi pare errato attribuire l'effetto constatato dal Sanarelli e cioè che le cavie vaccinate erano più sensibili all'azione della sua tossina di quello che le cavie nuove.

Resterebbe poi l'analogia tra le lesioni degli organi interni provocate dalla tossina di Sanarelli e quelle che si riscontrano nel tifo umano. Ma se a me è riuscito intossicando lentamente dei conigli con nucleina (1), cioè con una sostanza priva di ogni carattere di specificità, di avere sopratutto delle lesioni intestinali cospicue, con forte tumefazione delle placche di Peyer (in un coniglio ho visto una di queste placche raggiungere le dimensioni di una moneta da due centesimi), caduta delle cellule epiteliali, e magari perdita di sostanza da fare ammettere la esistenza di una vera ulcerazione; se, replico, questo ho potuto osservare con una sostanza che è da ritenersi comune a tutti i batteri conosciuti, non può essere ammessa come una prova dimostrativa a favore della sua specificità, la natura delle lesioni intestinali che la tossina di Sanarelli si è mostrata capace di determinare.

Gli è quindi per queste considerazioni, e per il fatto che nelle due importanti memorie del Sanarelli ora ricordate mancano dei dati relativi alla immunizzazione di animali da esperimento, che ho anche tralasciato di eseguire delle esperienze, le quali sarebbero del resto riuscite poco utili per la pratica quando si pensa — non fosse altro — al lungo tempo necessario per la preparazione di questa tossina.

Più tardi Lépin e Lyonnet (2) hanno dimostrato come il cane sia assai sensibile per iniezione endovenosa all'azione di una tossina preparata, mediante precipitazioni con alcool di brodo-culture adulte di 4 a 8 giorni e sterilizzate in precedenza per un'ora ad una temperatura di 56-60 gradi. Mancano però anche qui esperienze d'immunizzazione, non solo, ma io vedo nel precipitato alcoolico una mescolanza di prodotti alcuni specifici, altri no, una sostanza bruta di cui alcuni effetti nocivi possono essere eliminati seguendo il procedimento che andrò ora a riferire.

Esperienze di vaccinazione con la nucleo-albumina del tifo. — Sul valore biologico di questo prodotto tossico isolabile dalle brodo-culture di tifo ho avuto molte volte occasione di fare delle ricerche, e di pub-

---

(1) A. Paladino-Blandini. Riforma medica, 1901, nn. 163-164.
(2) Revue de médecine, 1897, p. 105, e Lyon médical, 1898, p. 343.

blicare i risultati avuti (1) e di esse, a questo punto del lavoro, non mi resta che accennare ai punti principali riferendo brevemente della parte che più da vicino riguarda il compito ora assuntomi.

L'uso della soluzione di soda e di potassa per estrarre dai corpi batterici degli albuminoidi attivi da essi contenuti non è recente, e Nencki se ne serviva nel 1880 per ottenere la sua micoproteina (2), e se ne serviva Buchner (3) per vincere la resistenza della membrana delle cellule batteriche ed ottenere in soluzione quegli albuminoidi contenuti nelle cellule stesse, a cui egli attribuisce la produzione di pus sterile (proteine di *b. coli*, di pneumobacillo di Friedländer, di prodigioso, di stafilococco piogeno aureo, ecc.), che si ottiene con la iniezione sottocute di culture morte di batteri patogeni e non patogeni. Io, incoraggiato dai risultati avuti da Bonome e Bombini con la loro *streptococcina*, da Lustig col suo *nucleo-proteide* del bacillo della peste, ho adoperato la liscivazione con soda sul precipitato alcoolico di brodo-culture *in toto* di tifobacillo adulte di 5 giorni e concentrate a bassa temperatura al decimo del loro volume, potendo così ottenere sciolte nell'alcali adoperato non solo quegli albuminoidi attivi contenuti nel corpo batterico, ma quegli altri ancora che da esso vengono, nel continuo succedersi delle generazioni, abbandonati per autolisi nel mezzo liquido ambiente, o che eventualmente dagli elementi vivi nel mezzo stesso possono essere messi in libertà per secrezione. Così ho potuto ottenere una nucleina, che a somiglianza della proteina, mediante l'impiego di soluzione debole di soda, isolata da Kossel (4) dal bacillo difterico, non ha nessun carattere di azione specifica, ed una nucleo-albumina, precipitata dall'estratto sodico a mezzo di acidificazione con acido acetico, e delle cui proprietà biologiche terrò ora brevemente parola.

La nucleo-albumina è una sostanza che allo stato secco ha un colorito giallo-brunastro; è insolubile in acqua, solubile negli alcali diluiti, capace di dare le reazioni delle sostanze albuminoidi; digerita in succo gastrico artificiale dà un residuo di pseudo-nucleina, ciò che mi convince sempre più della èsattezza della sua denominazione che non può per tale fatto essere cambiata con quella di *nucleo-proteide*, sostanza questa più complessa che lascia dopo la digestione artificiale un residuo di nucleina vera. Ha potere chemiotattico positivo, e azione debolmente tossica, azione che è in stretta dipendenza con la virulenza del germe da cui proviene (l'avvelenamento acuto dei conigli si ha, per iniezione endovenosa, con quantità di nucleo-albumina variabile da cgm. 8 a 21).

---

(1) Riforma medica, a. 1901, nn. 90, 163, 164; a. 1902, nn. 63, 64, 65, 66. Giorn. int. di scienze med., a. 1903. Gazzetta int. di medicina, a. 1903, n. 10. Il Policlinico, a. 1905, vol. XII-M.
(2) Nencki. *Beiträge z. Biol. d. Spaltpilze*. Leipzig, 1880, p. 45.
(3) Berlin. klin. Wochens., 1890, p. 673.
(4) Cent. f. Bakter., vol. XIX, a. 1898, p. 977.

Contrariamente a ciò che si è osservato per la tossina bruta del bacillo del tifo, e per i filtrati, o i liquidi tossici ottenuti per decantazione da vecchie culture solidamente resistenti ad elevatissime temperature, la nucleo-albumina sospesa in acqua, a somiglianza delle tossine schiette, perde ogni carattere di tossicità allorchè la si sottopone per 10 minuti a 100° o per un'ora a 60°; e come Buchner (1) notava che la resistenza al calore della tossina difterica aumentava se a quest'azione fisica essa viene sottoposta in liquidi privi di acqua (alcool amilico) o in soluzioni di parecchi sali (solfato sodico, ecc.), così al modo stesso sciolta la nucleo-albumina in soluzione di carbonato sodico, può essere sottoposta per mezz'ora all'azione del vapore d'acqua fluente senza perdere la sua particolare tossicità. Iniettata nei conigli, sottocutaneamente, nel sangue, nel cavo pleurico, sia essa fresca o inattivata al calore, dà luogo costantemente alla produzione di una specifica antitossina, e conferisce al siero di sangue un certo potere battericida dimostrabile in vitro, potere battericida che può essere fortemente aumentato quando alle iniezioni di nucleo-albumina si unisce anche l'iniezione — alla fine del trattamento — di mgm. 5 di nucleina, la quale, secondo il mio modo di vedere, con la leucolisi che produce, verrebbe a causare la messa in circolo di una forte quantità di *alessina* che unendosi all'abbondante *sensibilizzatrice* prodotta dall'azione della nucleo-albumina, darebbe per ciò stesso al siero il suo notato cospicuo potere battericida. Che il siero di conigli nucleo-albuminizzati contenga dell'antitossina specifica lo prova il fatto che anche iniettato in dose di $^1/_{10}$ di cmc., può esso ostacolare l'azione ipertermizzante della nucleo-albumina, e adoperato in quantità di $\frac{1}{2}$ cmc. è capace di impedire la morte di una cavia iniettata il giorno successivo con centgm. 7 di nucleo-albumina sottocute, dose certamente mortale per una cavia nuova. A completamento del quadro delle proprietà biologiche della nucleo-albumina del tifo devo aggiungere che essa ha proprietà agglutinogene, pare anzi — e il fatto è stato confermato da Casagrandi (2) — che l'agglutinina debba essere considerata come un prodotto di un'azione reciproca dei leucociti sulla nucleo-albumina che per essi si rende solubile nel siero, e della nucleo-albumina disciolta sui leucociti che sarebbero per essa stimolati alla produzione dell'agglutinina specifica.

Il fatto osservato è il seguente: Se ad una certa quantità di siero fresco di animale nuovo si aggiungono piccole tracce di nucleo-albu-

---

(1) Münch. medic. Wochens., 1893, p. 449.
(2) Questi Annali, 1903, p. 451.

mina, questa rimane indisciolta e le proprietà del siero restano immodificate; se invece la nucleo-albumina si addiziona ad una certa quantità di liquido leucocitico ottenuto dal peritoneo di un coniglio col procedimento di Schattenfroh (iniezione di aleuronato), la nucleo-albumina si scioglie e il liquido *acquista* un dimostrabile potere agglutinante (1 : 200).

Inoltre con quantità variabili di questa sostanza introdotte nell'organismo dei conigli per vie differenti e in quantità varie (centigrammi 3-8-12), sia che la iniezione della quantità totale della sostanza si faccia in una sola volta o in più volte a vario intervallo di tempo, si può conferire a questi animali un solido stato immune specifico che permette di iniettare ad essi, 10 giorni dopo l'ultima iniezione, fino a 4 D. M. L. di brodo-cultura di tifo senza comprometterne la salute. Dei conigli poi iniettati sottocute con ½ centgm. al giorno di nucleo-albumina per 6 giorni di seguito, si mantengono immuni per un periodo di tempo di non meno di 5 mesi.

Gran parte di queste esperienze sono state fatte con nucleo-albumina ottenuta da brodo-culture, ma tenendo conto dell'importanza che sulla quantità e sulla qualità dei prodotti del ricambio materiale dei microrganismi ha la qualità del sostrato nutritivo, importanza documentata, ad esempio, per il primo caso da tutto quello che sappiamo sulla buona scelta da fare del terreno nutritivo e del metodo di cultura per avere una forte produzione di tossina difterica, e per l'altro dagli studi di Cramer (1), per il colera, di Duclaux (2) sull'aspergillo e sul penicillio glauco, dai miei su di un bacillo giallo cromoforo rinvenuto in una urina (3), da quelli di Casagrandi sull'artificiale variabilità del trofismo di parecchi batteri (4), ecc.; dopo aver visto come siano sostanzialmente differenti le antitossine originatesi nel sangue degli animali trattati con tifo-nucleo-albumina estratta da brodo-culture e da tifo-culture su succo di carne, in quanto che esse si mostrano esclusivamente e squisitamente affini solo per quella qualità di nucleo-albumina che le ha originate; allo scopo di avere una nucleo-albumina in cui la tossina tifosa da essa contenuta potesse il più che possibile essere analoga a quella che viene dal germe prodotta nell'organismo infetto, ho coltivato il bacillo su una mescolanza di brodo nutritivo ordinario (nove parti) e sangue (una parte) direttamente immesso nel brodo dalla giugulare di una vitella.

---

(1) Arch. f. Hyg., 1892, p. 150.
(2) *Traité de Microbiologie*, vol. II, p. 84.
(3) A. Paladino-Blandini. Gior. int. di scienze mediche.
(4) L. c.

La cultura è lasciata per 5 giorni a 37°, quindi subisce la solita concentrazione al decimo, precipitazione con alcool, liscivazione del precipitato in soluzione di soda 0.5 %, filtrazione, precipitazione del filtrato con acido acetico. Di quèsta nucleo-albumina così ottenuta (chiamo in tal modo quest'ultimo precipitato solo per ragione di brevità e per analogia al prodotto ottenuto col medesimo procedimento dalle semplici brodo-colture) sono necessari 7 cgm., iniettati sotto cute, per uccidere una cavia di 300 gr., tossicità scarsa, come si vede, ma che non basta per escludere dal numero delle tossine schiette la sostanza tossica specifica in essa contenuta, sostanza che gode di tutte le proprietà sopra riassunte, e che mi fa ritornare colla mente al tempo in cui per avere l'intossicazione anche di una cavia con il prototipo delle tossine schiette, con la tossina difterica, bisognava iniettarne un numero considerevole di centimetri cubici, mentre oggi non vorremmo adoperare a scopo di immunizzazione una tossina di tal genere di cui almeno $^1/_{50}$ di cm^3 non uccida in 4 giorni una cavia di 250 gr.

Con questa nucleo-albumina ho eseguito esperienze riuscite di immunizzazione nei conigli, ma, sempre col proposito di aver sotto mano una unità di misura alla cui stregua poter giudicare infine della efficacia di tutti i mezzi di vaccinazione impiegati, tacerò di esse — che del resto sono state già riferite in un altro lavoro — e comunicherò solo le esperienze di vaccinazione eseguite sulle cavie.

Sei di questi animali sono stati iniettati sotto-cute con quantità differenti di nucleo-albumina sciolta in soluzione acquosa di carbonato sodico al ½ % e sterilizzata a 100° (vapor d'acqua fluente); le cavie reagiscono con una ipertermia e con un edema locale, al punto d'inoculazione, di intensità proporzionale alla quantità di nucleo-albumina introdotta. L'edema regredisce senza ulcerarsi, e all'ottavo giorno dall'avvenuta iniezione di nucleo-albumina, quando già da parecchi giorni la temperatura era ritornata al normale, e l'edema era scomparso, le sei cavie vennero infettate per la via del peritoneo con una dose sicuramente mortale di brodo-coltura di tifo assieme a due controlli. La esperienza, e l'esito avutone, è riassunto nella tabella seguente:

TABELLA XVII.

	Peso delle cavie	Quantità di nucleo-albumina iniettata	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata dopo 8 giorni — Cmc.	Esito	Osservazioni
1ª cavia	Circa 300 grammi ciascuna	1 mgr.	Edema appena sensibile	38°. 4	0. 45 %	+	La D. M. L. della brodo-cultura di prova adoperata corrispondeva a cmc. 0 35 %.
2ª »		2 »		38°. 2	»	+	
3ª »		2 »	Edema	38°. 8	»	—	
4ª »		5 »	Forte edema	39°. 7	»	—	
5ª »		1 cg.		40°. 1	»	—	
6ª »		2 »		40°. 0	»	—	
Controlli. 7ª cavia		»	..	..	»	+	
Controlli. 8ª »		»	..	...	»	+	

Partendo quindi dal dato che 2 cgm. di questa nucleo-albumina iniettati sotto-cute ad una cavia sono capaci di conferire ad essa l'immunità verso la successiva infezione, un'altra serie di osservazioni ho suggerito per vedere quando comparisce e quanto dura questo stato immune così artificialmente conferito.

A questo scopo otto cavie sono state iniettate tutte sotto-cute, e nella stessa giornata con 2 cgm. di nucleo-albumina sciolta in soluzione di carbonato sodico, e sono state quindi man mano infettate per la via del peritoneo con brodo-coltura di tifo in un tempo vario, da un minimo cioè di 3 giorni dalla avvenuta iniezione di nucleo-albumina, ad un massimo di 78 giorni dopo, ottenendo i risultati che qui appresso elenco:

TABELLA XVIII.

	Peso delle cavie	Quantità di nucleo-albumina iniettata — Cgm.	Tempo decorso fra l'iniezione del vaccino e l'infezione — Giorni	Quantità della cultura infettante — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia. .	Circa 300 grammi ciascuna	2	3	0. 45 %	+	La quantità % di cultura in brodo iniettata è stata sempre di $^1/_5$ superiore alla dose minima letale.
2ª » . .		»	6	0 50 %	—	
3ª » . .		»	15	0. 40 %	—	
4ª » . .		»	30	0. 35 %	—	
5ª » . .		»	45	0. 50 %	—	
6ª » . .		»	60	0. 55 %	—	
7ª » . .		»	75	0. 40 %	+	
8ª » . .		»	78	0. 40 %	+	

In base a questi risultati io devo dire che lo stato immune tarda non meno di tre giorni a manifestarsi e si mantiene per uno spazio di tempo che sta fra due mesi e due mesi e mezzo.

Un'ultima esperienza ho ancora eseguito per stabilire l'azione predisponente e adiuvante di questa sostanza sulla specifica infezione corrispondente, azione già dimostratasi posseduta dalla nucleo-albumina isolata dalle brodo-culture, e che in questa occasione ho potuto constatare come ugualmente posseduta anche da quest'altra varietà di nucleo-albumina

Tre cavie vengono iniettate nel peritoneo con la semplice dose minima letale di brodo-cultura, e quindi, lasciatane una come controllo, le due rimanenti sono iniettate sotto-cute una con 1, l'altra con 2 cgm. di nucleo-albumina; entrambe premuoiono al controllo.

Altre tre cavie sono inoculate con $^2/_3$ della D. M. L. di brodo-cultura e di esse, lasciandone una di controllo senza ulteriore trattamento, le altre due vengono 24 ore appresso iniettate rispettivamente sotto-cute con 1 e 2 cgm. di nucleo-albumina: il giorno dopo queste due cavie erano morte per setticemia tifica comprovata dalle prove culturali; il controllo rimaneva in vita.

Parallelamente alle precedenti e con le medesime modalità un'altra serie di esperienze è stata eseguita adoperando la nucleo-albumina inattivata al calore; ma anche in questo caso l'azione predisponente e adiuvante della sostanza si è dimostrata altrettanto evidente quanto nel caso precedente.

5. Esperienze di vaccinazione coi prodotti immunizzati estratti dai soli corpi batterici.

L'idea che le sostanze tossiche e immunizzanti specifiche potessero far parte integrale del corpo batterico, e che quella maggiore o minore attività dei filtrati di culture su terreni liquidi in varie occasioni riscontrata fosse dovuta a questi prodotti, o alle proteine che dalla cellula batterica caduta in sfacelo passano nel liquido ambiente, induceva parecchi autori a cercare di ottenere queste sostanze tossiche e immunizzanti dal mezzo che le conterrebbe, aiutandosi nella estrazione, affine di annullare o di rendere meno sensibile l'ostacolo opposto dalla membrana delle cellule batteriche, con mezzi chimici o fisici di svariata natura. I tentativi in questo senso, specie in questi ultimi anni, sono stati numerosissimi, e poichè male si presterebbero ad un aggruppamento sistematico per il fatto che spesso gli autori, allo scopo di vincere la resistenza anzidetta, si sono serviti di mezzi chimici e fisici contemporaneamente, così per quei procedimenti di più essenziale importanza su questo riguardo preconizzati, mi sono contentato di attenermi, nel loro esame sperimentale, il più che possibile all'ordine cronologico in cui essi sono stati pubblicati.

Ciò posto avrei dovuto cominciare le mie esperienze con *le proteine* di Cesaris-Demel e Orlandi (1) i quali, seguendo un procedimento già indicato un anno avanti da Foà e Scabia (2) per ottenere la loro *pneumo-*

---

(1) Arch. per le scienze mediche., 1893, pag. 302.
(2) Giornale della R. Ac. di Medic. di Torino, 1892, pag. 438.

proteina, filtrano su candela Chamberland una brodo-cultura (200 cm^3) di tifo adulta di 1-2 giorni, lavano a lungo i batteri rimasti sul filtro con soluzione fisiologica di cloruro sodico, quindi li emulsionano in soluzione acquosa di glicerina 5 % (20 cm^3), e così emulsionati li tengono per 24 ore a 60°. Queste proteine così preparate si possono secondo gli autori adoperare come tali, o anche filtrate con il medesimo successo; e suggeriscono come procedimento utile per la immunizzazione delle cavie due iniezioni sottocutanee a giorni successivi di 2 cm^3 di proteine, iniettando ancora nel 3° e 4° giorno 2 o 8 cm^3 delle stesse proteine nel peritoneo. Il fatto però che queste proteine vengono iniettate nel peritoneo, dove con una differenza di tempo di 2-7 giorni viene anche iniettata la dose mortale per il controllo della cultura infettante, permette di dubitare della effettiva efficacia del metodo di immunizzazione adoperato, e tenendo conto di quello che Issaeff ha ottenuto e che ho avanti in questo lavoro ricordato, questa tale maniera di immunizzare ed infettare per la medesima via fa venire il dubbio che si stia di fronte ad un semplice aumento di resistenza non specifico, il quale permetterebbe di rallegare le osservazioni di Cesaris-Demel e Orlandi sulla equivalenza biologica dei prodotti del b. del tifo e del b. coli, con i risultati avuti da Klein (1) il quale vedeva che il vibrione dal colera, quello di Finkler, il b. coli, il *proteus vulgaris*, il bacillo prodigioso e il bacillo del tifo possono essere a vicenda e indifferentemente impiegati per la immunizzazione contro una qualunque delle specie batteriche indicate, e con quelli più recentemente ottenuti con la *piocianasi immuneproteidina* da Emmerich e Loew (2) i quali di tale sostanza facevano un vero vaccino polivalente. Deve poi aggiungersi a questo, che gli stessi autori ammettono come a risultati poco costanti si giunga mediante una sola iniezione sotto-cute o nel peritoneo di proteine; e allora, poichè i risultati di cui è mia intenzione fare un finale paragone si sono ottenuti a mezzo di una unica iniezione — come quella che più risponde all'eventuale impiego pratico su larga scala nell'uomo — il fatto stesso di questa dichiarata incostanza di risultati mi ha indotto a non eseguire speciali esperienze in proposito.

Quattro anni dopo H. Buchner (3) comunicava i risultati ottenuti da suo fratello Edoardo Buchner col *saccaromices cerevisiae*, dalle cui cellule spezzettate prima mediante triturazione con polvere di quarzo e poi sottoposte ad una pressione di 4-500 atmosfere si poteva ottenere un succo cellulare ricco di una albumina schietta — la quale, indipendentemente da ogni azione batterica fermentativa, veniva a scomparire per un processo di autodigestione, quando il succo stesso veniva lasciato per qualche tempo al termostato — ed una diastasi capace di far subire allo zucchero la fermentazione alcoolica, diastasi a cui fu dato il nome di zimasi alcoolica o di *buchnerasi*. Resa, allora, possibile per il nuovo metodo la estrazione dal corpo cellulare di organismi inferiori di sostanze che si presentavano al loro stato naturale, non modificate, e straordinariamente attive,

---

(1) Klein, citato da Caesaris-Demel e Orlando, l. c.
(2) Zeits. f. Hygiene, 1901, vol. XXXVI, p. 9.
(3) Muench. medic. Woch., 1897, p. 1343.

fu volto lo stesso procedimento alla ricerca delle *plasmine* di diversi batteri, e delle loro proprietà, studio eseguito per la prima volta da Hahn (1), il quale in ciò era anche mosso dal concetto che nelle cellule batteriche doveva essere ricercata la sostanza immunizzante specifica. Egli eseguì le sue esperienze sul vibrione del colera, il bacillo del tifo, il bacillo del carbonchio ematico, e su alcuni stafilococchi. I germi coltivati per uno-due giorni a 37° su 50-40 scatole di Kolle, davano un rendimento di circa 30-40 gr. di patine che venivano triturate a mano o a macchina assieme a polvere di quarzo o di gusci di forami nifere, impastate quindi con acqua o con soluzione fisiologica di cloruro sodico, o con una soluzione acquosa al 20 % di glicerina, e poscia sottoposte ad una pressione di 4-500 atmosfere.

Il materiale così ottenuto veniva filtrato, e si aveva un liquido gialletto — plasmina — più o meno ricco di acqua e di sostanze albuminoidi, di cui — nel caso del tifo — bastava 1 cm^3 anche in una sola iniezione per premunire una cavia dalla infezione ad essa conferita per la via del peritoneo con una quantità di cultura capace di uccidere un controllo in 8-24 ore. Le cavie così trattate non reagivano alla iniezione di *plasmina* che con una debole elevazione di temperatura, il loro sangue acquistava un evidente potere battericida dimostrabile col metodo di Pfeiffer, e il siero di esse si mostrava agglutinante sino ad una diluizione di 1: 2000 anche dopo 2 mesi e mezzo da che l'iniezione della plasmina era stata fatta. Una certa conferma, poi, ricevono i risultati di Hahn da quelli ottenuti da Macfadyen e Rowland (2) per l'impiego da essi fatto di un processo di estrazione del plasma cellulare batterico quasi del tutto analogo a quello impiegato da questo autore.

Essi, difatti, coltivano il bacillo del tifo su agar, emulsionano la patina in soluzine fisiologica e poi centrifugano in modo da avere i corpi dei batteri perfettamente lavati, e quindi triturate le masse batteriche con acqua e sabbia di argento, le estraggono alla pressa (I estratto); riprendono poi la massa pressata, prima con soluzione di carbonato sodico, e dopo per una volta ancora con glicerina, pressando ogni volta e ottenendo così altri due estratti (II e III estratto). Sono i liquidi così ottenuti facilmente tollerati dalle cavie, che dalla iniezione di 6-8 cm^3 di estratto non risentono altro danno oltre una lieve ipertemia di 1-2 F. Il primo estratto iniettato ad una cavia in dose di 1 a 0.2 cm^3 la rende capace di sostenere più tardi la iniezione nel peritoneo di una quantità di cultura di tifo che uccide un controllo in 18-24 ore. Il siero di sangue delle cavie così trattate acquista un manifesto potere agglutinante (1: 500) e battericida; questo, però, assiema allo stato immune scomparisce fra la 4ª e la 6ª settimana, mentre si mantiene di più il potere agglutinante.

Ora, data l'importanza dei risultati conseguiti da questi autori, avrei ben voluto ripetere le loro esperienze, onde potermi formare, del metodo da essi proposto, e della efficacia immunizzante di questi estratti cellulari, un criterio personale, e di poterne in fine paragonare l'efficacia agli

(1) Muench. medic. Woch., 1897, p. 1344.
(2) Cent. f. Bakter., ecc. (Originale), vol. XXX, fasc. 20°, 1901.

altri mezzi di vaccinazione esperimentati; ma in Laboratorio manca una pressa idraulica, e perciò stesso ogni esperienza da questo lato mi si rendeva impossibile. Tuttavia, anche ammettendo che un semplice amore di novità spingesse i successivi autori a escogitare i nuovi e numerosi processi di estrazione di queste sostanze attive dai corpi bacillari, certi che alla *tifo-plasmina* di Hahn o al *I estratto* di Macfadyen spetti il valore ad essi assegnato da questi autori, dobbiamo tuttavia ammettere che con questi mezzi di immunizzazione attiva se si raggiunge uno specifico stato immune nella cavia, tale stato immune non si mantiene che per uno spazio di tempo di uno-due mesi al più.

Nel seguente anno il Brieger (1) nella intenzione di poter dimostrare come a due sostanze differenti vada attribuito il potere lisogeno ed agglutinogeno delle cellule batteriche del bacillo di Eberth, coltiva questo germe su agar per tre giorni, e ne emulsiona le patine in una soluzione diluita di carbonato di ammonio, a cui aggiunge solfato di ammonio in sostanza, fino a saturazione. L'emulsione viene sbattuta fino a che sia del tutto scomparso il suo originario odore di ammoniaca, e si lascia quindi il tutto in riposo per 1-4 giorni in luogo riparato dalla luce e e alla temperatura dell'ambiente. Trascorso questo tempo si filtra su carta, evitando di farvi cadere i cristalli di solfato di ammonio depositatisi al fondo del recipiente, si asciuga il filtrato e lo si emulsiona in una soluzione acquosa di soda diluita fino a comparsa di leggera reazione alcalina, si sbatte per mezz'ora e si filtra. Per l'autolisi del germe in tal modo provocata, si mettono in libertà, dal suo corpo cellulare, delle sostanze le quali iniettate — come ha provato Schutz (2). — nelle cavie e nei conigli; ripetutamente, in forti quanittà (20 cmc. di filtrato in una cavia) inducono nel siero di questi animali un potere agglutinante specifico che va da un minimo di 1 : 50 a un massimo di 1 : 1000 (contatto del siero e cultura 5 minuti, osservazione ad occhio nudo).

Lo Schutz non ci dice se il trattamento subito dalle cavie e dai conigli li avesse resi specificamente immuni, ma si può credere di no in base alle osservazioni da questo ricercatore eseguite sul potere battericida del siero di tali animali, e dalle quali risulta che tale siero iniettato nel cavo peritoneale delle cavie in quantità di ½-1 decimo di centimetro cubico. assieme ad un'ansa di tifo-cultura, non le salva dalla infezione. Ciò mi ha indotto senz'altro a mettere da canto ogni ricerca sperimentale su questo indirizzo e sono passato invece a studiare il

Potere vaccinante della tossina di Macfadyen e Rowland (3). — Il Macfadyen, sempre dominato dal concetto che per studiare i componenti attivi intracellulari di elementi figurati, vegetali o animali, bisogna evitare l'impiego di agenti chimici che modificano e denaturano

---

(1) Deut. med. Wochens., 1902, p. 477.
(2) Ivi, pag. 479.
(3) Deut. medic. Woch. (Ver. Beil.), pag. 310, a. 1903. — Cent. f. Bakt. Orig. Vol. XXXIV, n. 7-8, 1903.

queste sostanze, avendo sempre di mira i brillanti risultati ottenuti dal Buchner col saccaromices cerevisiae, si proponeva di studiare da questo punto di vista un certo numero di batteri patogeni, per i quali — a suo dire — era inammissibile l'idea di una secrezione tossica, e non era stato sufficientemente dimostrata la presenza di una endotossina. Tra questi germi vi sarebbe il tifo, che è quello dagli autori preso in ispeciale considerazione, e per spezzare le cui cellule, escludendo anche qualunque mezzo estraneo — come la sabbia, i gusci di foraminifere, ecc. — essi si giovano della diretta triturazione delle patine batteriche in aria liquida. Gli elementi batterici irrigiditi e resi fragili dal profondo abbassamento della temperatura (— 190° C.) si spezzano facilmente sotto la diretta azione del pestello, e i succhi cellulari, non più contenuti dalla membrana batterica, possono agevolmente passare nel liquido di estrazione rappresentato dalla soluzione fisiologica di cloruro sodico. Operando in tal modo, e centrifugando quindi, gli autori hanno ottenuto un liquido privo di germi e assolutamente libero di particelle corpuscolari, tossico per le cavie, in dose di 3-20 milligrammi, e che iniettato a dosi successive nelle scimmie, conferiva al siero di sangue di questi animali proprietà antitossiche e battericide specifiche.

Seguendo la tecnica sopradetta, io ho emulsionato le patine culturali di tifo ottenute su 10 tubi di agar solidificato a becco di clarino nella stessa acqua di condensasione dell'agar adoperato allo scopo di ridurre al minimo possibile il volume del liquido diluente, che solidificandosi verrebbe ad ostacolare non poco l'atto della triturazione, e quindi congelata questa emulsione di consistenza sciroppossa con l'aggiunta di aria liquida, ne ho iniziata la triturazione che, in mancanza di un congruo apparecchio mosso dalla corrente elettrica — apparecchio adoperato dai due ricordati autori — ho eseguito a mano prolungandola pazientemente per due ore di seguito. In questo tempo, naturalmente, venivano mano mano aggiunte sempre nuove quantità di aria liquida. Eseguita questa operazione, la polvere risultante è stata addizionata con soluzione fisiologica di cloruro sodico, fino a raggiungere un volume totale di 12 cmc., e lasciata per mezza giornata alla temperatura ambiente. In seguito, non essendo sicuro di potere sbarazzare il liquido dagli elementi corpuscolari in esso sospesi a mezzo della semplice centrifugazione con la centrifuga a mano, che si possiede in Laboratorio, ho filtrato su filtro di Puckal, ottenendo un liquido giallo citrino del quale mi sono servito per le seguenti esperienze.

Quattro cavie sono state iniettate sotto cute con quantità varie di estratto da 2 a 0. 2 cmc. e, salvo un leggero edema al punto di inoculazione, ed una modica elevazione di temperatura riscontrata nel

giorno successivo in qualcuna di esse, nessuna ha mostrato di risentire altro danno dalla subìta iniezione, ciò che dimostra la tenue tossicità dell'estratto, dovuta forse alla doppia circostanza dello incompleto spezzettamento dei germi, per cui solo scarse quantità di succo cellulare potevano passare nel liquido estrattore, e alla filtrazione su candela i cui pori — è notorio — possono trattenere per adesione una certa quantità delle sostanze albuminoidi che attraverso ad essi vengono fatte passare. Tale fatto però non è stato di ostacolo al conferimento della immunità ad alcuni degli animali trattati, i quali, scomparso l'edema, constatato il ritorno della temperatura al normale, già infra le 48 ore, sette giorni appresso l'avvenuta iniezione del liquido in esame, infettati con una quantità mortale di brodo-cultura per via intraperitoneale hanno reagito come appresso:

TABELLA XIX.

	Peso delle cavie	Quantità di tossina iniettata — Cmc	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Quantità della cultura iniettata dopo 7 giorni — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia . . .	Circa 300 grammi ciascuna.	2	Lieve edema	39. 2	0. 50 %	+	La brodo-cultura infettante ha una D.M.L. = 0.40 per cento.
2ª » . . .		1	Id.	38. 5	»	—	
3ª » . . .		0. 5	Assenza di edema	38	»	—	
4ª » . . .		0. 2	Id.	38. 2	»	+	
Controllo . . .		..	...	..	»	+	

Se, pertanto le piccole come le forti dosi analogamente a quello che Wright aveva osservato per il suo vaccino e che per altri vaccini abbiamo potuto constatare, sono incapaci di rendere immuni le cavie, vi sono invece dosi intermedie che questa immunità sicuramente conferiscono.

Tale stato immune è però di breve durata, in quanto che infettando delle cavie già contemporaneamente vaccinate a diverso periodo di tempo, non le ho viste sopravvivere all'infezione oltre un mese dalla avvenuta vaccinazione, cosa che appare dalla seguente tabella:

TABELLA XX.

	Peso delle cavie — Gr.	Quantità di tossina iniettata — Cmc.	Tempo decorso fra la vaccinazione e la infezione	Quantità di cultura iniettata — Cmc.	D. M. L. della cultura infettante — Cmc.	Esito
Cavia 1ª . . .	350	1	15 giorni	0.45 %	0.35 %	—
» 2ª . . .	300	1	30 »	0.50 %	0 40 %	—
» 3ª . . .	320	1	37 »	0.40 %	0.35 %	+
» 4ª . . .	340	1	45 »	0.30 %	0.25 %	+
» 5ª . . .	335	1	45 »	0.30 %	0.25 %	+

Infine come per parecchi dei vaccini esaminati abbiamo potuto constatare, la tosssina di Macfadyen ha, nella dose vaccinale, una rilevabile azione adiuvante sulla infezione, in quanto che se di due cavie infettate il giorno avanti con 2/3 della D. M L. e iniettate il giorno appresso con 1 cmc. di tossina, nessuna è morta, sono morte invece per constatata setticemia tifica due altre cavie iniettate contemporaneamente con le medesime 'dosi ora cennate di brodo-tifo-cultura nel peritoneo, e di tossina sotto cute.

Questo, per quello che più strettamente riguarda al nostro tema; non posso però fare a meno di ricordare l'opinione che credono di potere avanzare Bassenge e Mayer (1) sulla tossina di Macfadyen. Essi adoperano come processo di estrazione quello suggerito da questo autore, modificandolo leggermente nel senso che la triturazione alla temperatura dell'aria liquida viene eseguita aiutandosi con polvere di quarzo e ripetendola per 2-3 volte, con l'avvertenza di lasciare ridisciogliere fra una triturazione e l'altra la massa batterica, e filtrando infine il liquido su candele invece di centrifugarlo. Questi autori constatano che il siero di sangue di conigli trattati con quantità crescenti di estratto agglutina il bacillo del tifo in una diluizione di 1 : 100, che alla dose di cmc. 0. 05 salva le cavie dalla azione infettante di 3-4 dosi mortali di agar-cultura, che dà un precipitato allorchè viene mescolato allo estratto stesso, e solo per il fatto che questo è poco tossico (non meno di 1 cmc. per uccidere una cavia di 200-300 gm.) credono che esso sia da riguardarsi come un estratto tossico analogo a quello che si può ottenere da qualunque cellula estranea all'organismo, e che nulla ha da vedere con la tossina specifica

(1) Cent. f. Bakter. Orig. Vol. XXXVI, p. 332.

del germe. Ora, io, per altre ragioni a cui ho avanti anche in questo lavoro accennato, sono perfettamente d'accordo con questi autori nel ritenere che la tossina prodotta dal bacillo del tifo in cultura artificiale sia differente da quella prodotta nell'organismo animale infetto, causa di malattia e di morte; divido ancora la loro opinione nello ammettere che il bacillo del tifo sia un germe a secrezione tossica come la difterite e il tetano; ma però non mi sembra che dai risultati delle loro esperienze possa tale dimostrazione venire data, in quanto che male si potrebbe negare il carattere di tossina specifica ad una sostanza che, come quella contenuta nello estratto avuto da Bassenge e Mayer, si mostra agglutinogena e capace di dar luogo alla produzione non solo di specifiche precipitine ed antitossine (per quanto, a dire degli autori, in grado non cospicuo), ma anche alla produzione — per come loro ritengono — di una specifica sostanza battericida.

Tutte queste cure, però, tendenti a vincere gli ostacoli dell'involucro cellulare per potere ottenere in soluzione i prodotti attivi contenuti nella cellula batterica, sarebbero, secondo Conradi (1), superflue.

Egli ricorda, ed io lo ho anche ricordato avanti, i fenomeni di autodigestione che intervengono in quella sostanza albuminoide da E. Buchner spremuta dalle cellule del saccaromices cerevisiae, cita i propri lavori relativi alla dimostrazione di fermenti batteriolitici prodottisi nella decomposizione per autolisi di cellule vegetali ed animali, accenna ai lavori di Emmerich e Loew riguardanti l'azione batteriolitica che esercitano i prodotti del ricambio materiale esistenti nelle vecchie culture di bacillo piocianico, e si chiede se la distruzione fisiologica che interviene nelle culture artificiali dei batteri non sia dovuta alla azione batteriolitica dei fermenti, o di un fermento prodotto dai germi stessi.

A questo quesito egli dà una risposta positiva, e per citare un esempio, ricorda che la diminuzione di numero dei vibrioni del colera nelle brodo-culture, diminuzione che porta questi germi a tale un numero da rappresentare dopo 48 ore il 7.43 % e dopo tre giorni solo il 0.8 % di quelli contenuti nella stessa cultura di 24 ore di età, non è dovuta al fatto che il terreno nutritivo si esaurisce, giacchè basta rinchiudere in un sacchetto sterile di pellicola di canna una piccola quantità di questa cultura e sottrarre ad essa per dialisi le sostanze battericide autolitiche che contiene, per vedere il numero dei batteri elevarsi di nuovo. E allora, anche per il fatto che questo fermento autolitico è solubile in acqua, non ci sarebbe che semplicemente da abbandonare i germi alla azione del loro stesso fermento, abbandonarli ad un'auto-digestione per ottenerne liberi i costituenti cellulari.

Io, veramente, male mi spiego come, date queste proprietà, tutti gli sperimentatori abbiano potuto nel caso del bacillo del tifo — salvo qualche

(1) Deut. medic. Wochens., 1903, pag. 26.

eccezione — constatare la scarsa attività dei filtrati di brodo-culture in seno alle quali pure l'azione di questo fermento dovrebbe spiegarsi, ma senza fare discussioni, rimanendo in un campo puramente obiettivo, dirò che il Conradi seguendo questo suo ordine di idee, coltiva il germe su decozione di carne addizionata di agar 3 % e di 1 % di *tropon* e distribuito in scatole i cui coverchi sono saldati al fondo a mezzo di uno strato di paraffina decorrente lungo il loro bordo inferiore. Le scatole stanno circa 20 ore in termostato a 37°, poi ne vengono raschiate le patine che sono emulsionate in soluzione fisiologica (0.85 %) di cloruro sodico, e mantenute in termostato ancora per 24-48 ore. I batteri sedimentano; allora si pipetta il liquido soprastante, lo si diluisce con cinque volumi di soluzione fisiologica, si filtra alla Berkefeld, e il filtrato si concentra nel vuoto e a 35° fino a 1/10-1/50 del suo volume. Si deve aver cura di non protrarre l'autolisi per oltre 48 ore, e di non addizionare antisettici; in entrambi i casi il valore della tossina viene a scadere. Con una tossina ottenuta in tal modo (autolisi asettica) si può a mezzo di una quantità di 0.2 cmc. uccidere in 24 ore una cavia di 300 grammi. L'autore però non aveva eseguito allora, e fino ad ora non ha pubblicato, ulteriori esperienze riguardanti il valore immunizzante di questa sua tossina; ma la lacuna è stata di recente colmata da Brieger e Mayer con le osservazioni che ora vengo ad esporre e che io ho potuto sperimentalmente controllare.

Potere vaccinante dello estratto di Brieger e Mayer (1). — Questi autori sono di opinione che si può mediante l'*autolisi asettica* separare dai corpi batterici una sostanza agglutinogena e lisogena, la quale con la tossina del tifo non avrebbe niente che fare; questa che è intimamente legata alla cellula batterica non si metterebbe in libertà che in seguito al suo completo sfacelo, e li induce a questa deduzione anche l'osservazione che, facendo procedere l'autolisi alla temperatura della stanza (15° C.) o a quella della stufa (37° C.) il numero dei batteri disfatti è scarso nel primo caso, abbondante nel secondo e in corrispondenza il liquido filtrato del primo saggio è sprovvisto di ogni carattere di tossicità, il secondo è tossico bastando di esso 1 cmc. per uccidere un coniglio inoculato per via endovenosa (2). Entrambi i filtrati però possono conferire al siero di sangue dei conigli proprietà specifiche agglutinanti e battericide: basterebbe di fatti una sola inie-

(1) Deut. med. Wochens., 1904, n. 27.

(2) Non posso fare a meno di ricordare, a questo punto, che questi due autori un anno prima, trattando le masse dei batteri ottenute col già descritto procedimento di Brieger con acqua leggermente alcalinizzata, lasciando che l'autolisi a 37° divenisse completa, filtrando quindi su filtro Puckall, ottenevano un filtrato, a loro dire, del tutto privo di ogni carattere di tossicità (Wir moechten also hier betonen, dass unsere Substanzen keinen toxischen Character zeigten; v. Deut. medic. Wochens., a. 1902, p. 310).

zione di 10 cmc. fino a 0.1 cmc. di filtrato, iniettato nel sangue ad un coniglio per rendere dimostrabile otto giorni dopo nel suo siero di sangue un potere agglutinante che va fino ad una diluizione massima di 1 : 1600, ed un potere battericida che si manifesta anche adoperando il siero in quantità di cmc. 0.005. Avremmo quindi evidentemente sotto mano un prodotto immunizzante specifico che per la sua innocuità, per la sua facile e rapida preparazione, per la efficacia che i due autori gli attribuiscono, sarebbe veramente quanto di meglio si possa desiderare per un utile e largo impiego a scopo di immunizzazione attiva dell'uomo.

In conseguenza di ciò mi sono accinto all'esame di questo estratto, e seguendo alla lettera il metodo adoperato da Brieger e Mayer, adoperando il solito campione di tifobacillo servitomi alle precedenti esperienze e le cui brodo-culture di 24 ore a questo momento avevamo una considerevole virulenza (D.M.L. = 0.30 %) faccio otto innesti su agar solidificato in tubi a becco di clarino e lascio le culture al termostato per 24 ore. Trascorso questo tempo, le patine di tali culture vengono emulsionate in 40 cmc. d'acqua distillata, e quindi lascio una metà di questa emulsione — che indicherò per brevità con il segno E A — all'oscuro e alla temperatura ambiente, ponendo l'altra metà (E T) al termostato a 37° C., e dopo 24 ore entrambe le due emulsioni vengono filtrate su filtro di Puckal, ricavandosene due liquidi di colorito giallo-citrino, perfettamente trasparenti, liquidi di cui volli innanzi tutto studiare l'azione tossica.

Usando a questo scopo le cavie come animali da esperimento, inietto sotto cute a quattro di esse di circa 300 gm. di peso ciascuna 1, 2, 4, 6 cmc. di estratto E A, e ad altre quattro, data la supposta maggiore tossicità, per la medesima via inietto rispettivamente 3, 2, 1, ½ cmc. di estratto E T. E con mia somma sorpresa tutte le cavie così trattate restarono in vita, non mostrando di aver risentito dalla iniezione altro effetto che una modica reazione locale manifestatasi con un edema più o meno di rilievo, ma in ogni caso non più ampio di una moneta da 10 centesimi. Essendosi non più tardi della 4ª giornata, poi, riassorbito l'edema, tenendo conto che i due autori del metodo già dopo 8 giorni dicono di aver constatato nel sangue dei conigli un cospicuo potere agglutinante e battericida, ritenendo per ciò stesso che sarebbe bastato questo periodo di tempo perchè in seguito all'iniezione dell'uno o dell'altro estratto, lo stato immune si potesse stabilire, tutte le 8 cavie sopravissute alla subita iniezione di questi estratti, 8 giorni appresso vennero infettate per la via del peritoneo con una dose di brodocultura sicuramente mortale. L'esito dell'esperimento non poteva però essere più sconfortante, in quanto che delle cavie inoculate nessuna si

è salvata, non solo, ma non mi è neanche riuscito di costatare un qualsiasi ritardo nella durata del periodo d'infezione di fronte ai controlli, ciò che mi ha deciso a non eseguire ulteriori tentativi. L'esperienza è riassunta nella tabella seguente:

TABELLA XXI.

		Peso delle cavie	Quantità di estratto iniettato — Cmc.	Reazione locale	Quantità di cultura iniettata dopo 8 giorni — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
E A.	1ª cavia	Circa 300 grammi ciascuna	1	assente	0. 50 °/₀	+	Dose minima letale della brodo-cultura di prova iniettata = cmc. 0. 40 °/₀.
	2ª »		2	lieve edema	»	+	
	3ª »		4	edema	»	+	
	4ª »		6	id.	»	+	
Controllo	5ª »		. .	. .	»	+	
E T.	6ª »		0. 5	lieve edema	»	+	
	7ª »		1	id.	»	+	
	8ª »		2	edema	»	+	
	9ª »		3	id.	»	+	
Controllo	10ª »		. .	. .	»	+	

Potere vaccinante della tossina di Balthazard. — Nell' anno precedente a questa pubblicazione di Brieger e Mayer, per la quale, onde seguire lo sviluppo del concetto dell'autolisi asettica di Conradi, ho interrotto la decisa esposizione in ordine cronologico delle ricerche eseguite in questo genere di studi, Balthazard (1) comunicava i risultati da lui ottenuti a mezzo di una tossina da lui con un procedimento speciale estratta dal corpo dei bacilli del tifo.

Il metodo da lui preconizzato consiste nel coltivare su agar il germe in questione, e sbarazzare le patine batteriche di ogni prodotto estraneo con l'emulsionarle in soluzione di cloruro di sodio (0.85 %) e centrifugarle. Il deposito viene ripreso con soluzione acquosa di urea al 2 %, o di cloridrato di ammonio all'1 %, e la nuova emulsione, chiusa in tubi saldati alla lampada, viene sottoposta a ripetute congelazioni e disgelazioni

(1) *Toxine et antitoxine typhique.* Paris, 1903.

(Buchner). La disgelazione si fa intervenire elevando la temperatura a 58° C., e la emulsione viene da ultimo filtrata su porcellana. Seguendo alla lettera questo metodo, e adoperando come liquido di estrazione la soluzione di urea, ho potuto prepararmi un estratto ogni due cmc. del quale corrispondono ad una cultura su agar di tifo-bacillo; con esso ho eseguito le seguenti esperienze:

Quattro cavie, di peso quasi uguale, sono state iniettate nel cellulare sottocutaneo con 4, 2, ½, $^1/_{10}$ di cmc. di estratto; si ha in alcune una modica e transitoria elevazione di temperatura, e un lieve edema al punto di inoculazione, edema che già dopo 3-5 giorni si è completamente riassorbito. Trascorsi 7 giorni dall'avvenuta iniezione, le quattro cavie assieme ad un controllo vengono iniettate nel peritoneo con una quantità mortale di brodo-cultura, quantità che da due di esse viene sopportata senza danno. L'esperienza è esposta nella tabella seguente:

TABELLA XXII.

	Peso delle cavie	Quantità di estratto iniettato — Cmc.	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª	Circa 250 gr. ciascuna	3	Edema	39°. 2	0. 40 %	—	D. M. L. della brodo-cultura infettante = cmc. 0. 30 %.
» 2ª		2	Lieve edema	39°. 4	id.	—	
» 3ª		0. 5	Id.	38°. 4	id.	+	
» 4ª		0. 1	Assenza di reazione locale	38°. 2	id.	+	
Controllo		—	..	..	id.	+	

Ho potuto poi constatare che, nella dose vaccinante, questo estratto non mostra di aver *proprietà predisponenti e adiuvanti* di qualche rilievo: due cavie, difatti, infettate entrambe con $^2/_3$ della dose minima letale di tifo-brodo-cultura nel peritoneo, e poi una contemporaneamente e l'altra il giorno appresso iniettate sottocute con 3 cmc. del liquido in esame, sono rimaste in vita.

Esperienze relative alla durata dello stato immune non si sono — per varie ragioni — potute eseguire.

Esperienze di vaccinazione col metodo dei « recettori liberi ». — Neisser e Shiga (1) — come ho già avuto in questo lavoro occasione di accennare — dimostravano nel 1903, che emulsionando una patina di cultura su agar di bacilli del tifo in soluzione fisiologica di cloruro sodico, riscaldando questa emulsione per un'ora a 60°, lasciandola in seguito per 2 giorni a 37°, e da ultimo filtrando su filtro di Reichel, si ottiene un liquido, il quale per avere la proprietà di fissare l'agglutinina di un siero specifico, e di ridurre la zona del *proagglutinoide*, mostra — secondo gli autori — di contenere allo stato libero dei recettori abbandonati dalle cellule batteriche. L'ipotesi sarebbe anche appoggiata dall'osservazione che la iniezione di 10 cmc. di questo estratto (1 cultura) nelle vene di un coniglio, ripetuta con un certo intervallo di tempo per 2-3 volte ancora, conferisce al siero di sangue di questo animale un elevato potere agglutinante e battericida.

Lo Shiga (2) nell'anno seguente usava il metodo dei *recettori liberi* per un primo tentativo di immunizzazione attiva dell'uomo sperimentando, su se stesso e sul dott. Liepstein, e ottenendo i risultati che ho esposti nella parte generale; e Wassermann (3) nello stesso anno in cui Neisser e Shiga pubblicavano il loro lavoro, fondandosi su quello che essi avevano osservato, ne modifica, per quanto non sostanzialmente, il metodo di estrazione, ed esegue delle esperienze di immunizzazione sui conigli. Egli coltiva il bacillo del tifo su agar, emulsiona ogni cultura in 30 cmc. d'acqua distillata invece che in 10 o in 5 cmc. di soluzione di cloruro sodico, porta a 60° per un'ora, quindi tiene l'emulsione per 5 giorni — invece che per 2 — a 37° e filtra. Il filtrato a solo scopo di conservazione (l'A. non lo dice, ma è lecito ammettere che questa sia la sola ragione) viene concentrato nel vuoto e portato a secchezza, ottenendosi così una polvere biancogrigiastra, la quale iniettata nel sangue a tre conigli in dose di 5 mgm. 1 cgm. e 2 cgm., corrispondenti rispettivamente a ½, 1, 2 cmc. di soluzione, nello spazio di 7 giorni eleva il potere battericida del siero di sangue di questi animali a un punto tale per cui bastano 0.005 cmc. di tale siero per salvare dalla morte una cavia infettata con una quantità varie volte mortale di agar-tifo-cutura (metodo Pfeiffer).

Io ho esperimentato con l'uno e l'altro dei due estratti, allestiti secondo Shiga e secondo Wassermann, adoperando quest'ultimo, però, senza fargli subire un preventivo essiccamento; i risultati avuti sono i seguenti:

a) *Estratto di Shiga.* — Otto patine di cultura su agar in scatole di Petri (10 cm. di diametro), sono state emulsionate in 24 cmc. d'acqua, tenute a 60° per un'ora, a 37° per due giorni, quindi filtrate su filtro di Puckall. Il filtrato, distribuito in boccette chiuse alla lam-

---

(1) Deut. medic. Woch., 1903.
(2) Berl. klin. Wochens., 1904, n, 4.
(3) Festsch. z. sechzig. Geburtstage v. R. Koch, 1903, pag. 538.

pada e conservato all'oscuro e a bassa temperatura, in una prima esperienza è stato iniettato sottocute a tre cavie in dose di 1, 0.25, 0.1 cmc. Il giorno appresso si nota un leggero edema in tutte e tre le cavie al punto di inoculazione, e solo nella prima una leggera ipertermia. L'edema si riassorbe rapidamente senza dar luogo a necrosi della cute sovrastante, e al 6° giorno dalla avvenuta iniezione dello estratto, le tre cavie assieme ad un controllo vengono infettate per la via del peritoneo con una quantità mortale di brodo-cultura di tifo. Delle quattro cavie, così trattate, tre muoiono (compreso il controllo) nelle 24 ore; una, quella trattata in precedenza con $^1/_{10}$ di cmc. d'estratto, si salva. In vista di questo risultato, ho indagato se eventualmente la morte delle due prime cavie fosse dovuta ad un tempo insufficientemente lungo lasciato al compiersi del periodo di reazione; e con tale intendimento ho diviso un gruppo di 12 cavie in tre lotti di 4 cavie ciascuno, iniettando sottocute a ciascuna delle cavie di ogni lotto dosi ugualmente decrescenti di filtrato, da 2 cmc. a $^1/_{10}$ di cmc., e infettandone quindi un primo lotto al 4° giorno, un secondo al 10°, l'ultimo al 15° giorno. L'esito avuto è quello che nella tabella qui appresso viene segnato:

TABELLA XXIII.

	Peso delle cavie	Quantità di filtrato iniettato — Cmc.	Reazione locale	Quantità di brodo-cultura iniettata — Cmc.	Esito della infezione conferita in seguito alla vaccinazione: 4 giorni dopo	10 giorni dopo	15 giorni dopo	Osservazioni
1ª cavia	Peso generale oscillante fra grammi 270 e grammi 320	2	Si ha edema al punto di inoculazione, edema più o meno notevole, ma sempre di poco rilievo in tutte le cavie trattate; l'ipertermia verificatasi nelle 24 ore successive alla iniezione del filtrato è di poca entità, e non è comune a tutte le cavie.	0.35 %	+ (*a*)	..	..	La quantità di brodo-cultura adoperata per infettare le cavie è stata sempre di $^1/_8$ superiore alla semplice D. M L.
2ª »		1		id.	+ (*a*)	..	.	
3ª »		0.5		id.	+	..	..	
4ª »		0.1		id.	+ (*r*)	..	..	
5ª » (controllo)		..		id.	+	..	..	Il segno (*r*) indica che la cavia è morta con ritardo sul controllo; il segno (*a*) che la morte delle cavie è avvenuta prima di quella del controllo.
6ª »		2		0.40 %	..	+	..	
7ª »		1		id.	..	+ (*a*)	..	
8ª »		0.5		id.	..	—	..	
9ª »		0.1		id.	..	—	..	
10ª » (controllo)		..		id.	..	+	..	
11ª »		2		0.50 %	..	..	+	
12ª »		1		id.	..	..	—	
13ª »		0.5		id.	..	..	—	
14ª »		0.1		id.	..	..	—	
15ª » (controllo)		..		id.	..	..	+	

Dopo di aver fissato la quantità d'estratto necessaria al conferimento dell'immunità, un'altra serie di esperienze ho eseguito per vedere quanto dura questo stato immune successivo all'iniezione del vaccino. A tale scopo 5 cavie sono state iniettate contemporaneamente sottocute con 0.5 cmc. di filtrato, e infettate quindi a vario intervallo di tempo da 15 giorni a 2 mesi circa, con il seguente esito:

TABELLA XXIV.

	Peso delle cavie	Quantità di filtrato iniettato — Cmc.	Tempo decorso fra la vaccinazione e la infezione	Quantità di cultura infettante	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia. . .	Fra 250 e 300 grammi	0.5	15 giorni	0.50 %	—	La quantità di cultura in brodo adoperata per la infezione di prova è di $^1/_4$ superiore alla D.M.L.
2ª » . . .		»	30 »	0.40 %	—	
3ª » . . .		»	40 »	0.45 %	—	
4ª » . . .		»	65 »	0.35 %	+(r)	
5ª » . . .		»	68 »	0.40 %	+	

L'esame del potere adiuvante — per quanto la esperienza esposta nella tab. XXIII imponga di accettare i seguenti risultati con una certa riserva — è riuscito del tutto negativo, in quanto che di due cavie infettate per la via del peritoneo con $^1/_2$ — al solito — della D. M. L. di brodo-cultura, e poi una contemporaneamente e l'altra il giorno appresso iniettate con 0.5 cmc. del filtrato in esame, nessuna è morta.

Non ho, poi, voluto abbandonare lo studio delle proprietà immunizzanti di quest'estratto, senza ricercare quali proprietà speciali esso conferisce al siero di sangue degli animali con esso vaccinati, rivolgendo precisamente l'attenzione al potere battericida di tale siero, come quello a cui maggiore importanza si assegna ad indicare il grado di specifica resistenza acquisito dall'animale sottoposto all'esperimento. A questo scopo, poichè dalle esperienze precedenti ero reso sicuro che una quantità di ½ cmc. di filtrato immunizza certamente una cavia di 300 gm. in un periodo di tempo di 10 giorni, una cavia di tale peso, iniettata sottocute con la ora detta quantità di filtrato, venne 10 giorni dopo

svenata e dal sangue raccolto si lasciò separare il siero. Con questo, mescolato in quantità di $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ e $^1/_{1000}$ di cmc. ad una dose di brodocultura di poco superiore alla mortale vennero inoculate nel peritoneo tre cavie di 250 gm. ciascuna. Il giorno appresso le tre cavie erano morte, cosa che se non esclude che ripetendo le iniezioni di filtrato il siero di sangue della cavia avrebbe potuto acquistare un dimostrabile e rilevante potere battericida, ci mette tuttavia in grado di dire che anche per il tifo noi possiamo trovarci nel caso di un animale certamente vaccinato senza che per ciò stesso il suo siero di sangue avesse acquistato delle proprietà umorali tali da renderlo direttamente nocivo alla vita del germe corrispondente.

b) *Estratto di Wassermann.* — Quattro culture di 24 ore su agar vengono emulsionate in 40 cmc. d'acqua distillata. L'emulsione è tenuta prima a 60° per 1 ora, poi a 37° per 5 giorni, e quindi viene filtrata su filtro di Puckal. Il filtrato appena ottenuto viene adoperato per iniettare sottocute cinque cavie con quantità decrescenti da cmc. 3 a $^1/_{50}$ di cmc.; le cavie dopo 6 giorni vengono infettate per la via del peritoneo con una dose certamente mortale di brodo-cultura. Una seconda serie di altre cinque cavie iniettata con le medesime quantità e nello stesso giorno delle cavie della prima serie, viene ugualmente infettata dopo 10 giorni dall'avvenuta iniezione dell'estratto. Quasi tutte le cavie iniettate reagiscono alle iniezioni dell'estratto con edema locale e con una modica elevazione di temperatura, e si sono comportate di fronte all'infezione nella maniera qui appresso segnata:

TABELLA XXV.

	Peso delle cavie	Quantità di filtrato iniettato — Cmc.	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Tempo decorso fra l'iniezione del vaccino e l'infezione — Giorni	Quantità di cultura infettante — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia	Fra 250 e 300 grammi ciascuna	3	edema	39. 4	6	0. 40 %	+ (*a*)	La quantità di cultura in brodo adoperata per la infezione di prova è di $^3/_5$ circa superiore alla minima mortale. Il segno (*a*) indica che le cavie relative sono premorte al controllo.
2ª »		1	id.	39. 0	»	»	+ (*a*)	
3ª »		0 50	id.	39. 2	»	»	—	
4ª »		0. 10	edema leggiero	38. 7	»	»	—	
5ª »		0 02	assenza di edema	38. 2	»	»	+	
6ª » (controllo).		..	..	..	..	..	+	
7ª »		3	edema forte	39. 2	10	0. 50 %	+ (*a*)	
8ª »		1	edema	39. 4	»	»	—	
9ª »		0. 50	id.	39. 0	»	»	—	
10ª »		0. 10	scarso edema	38. 4	»	»	—	
11ª »		0 02	assenza di edema	38. 5	»	»	+	
12ª » (controllo).		..	..	..	..	»	+	

Speciali ricerche tendenti a stabilire la durata dello stato immune e l'*azione adiuvante* dello estratto di Wassermann non sono state eseguite, potendosi ammettere, data la tecnica di sua preparazione, che i risultati che si sarebbero potuti ottenere non avrebbero potuto discostarsi gran che da quelli avuti con l'estratto di Shiga.

Per completare infine questa rassegna devo ricordare i lavori di Kierstein e quello di De' Rossi. Di questi due autori il primo (1) essiccava delle masse di bacilli del tifo, li uccideva con alcool, li portava di nuovo a secchezza e li triturava fino ad avere una finissima polvere di cui egli, o direttamente, o estraendola per tre giorni a 37° con glicerina e soluzione 0.80 % di cloruro sodico a parti eguali e adoperando l'estratto, si serviva per trattare con ripetute iniezioni i conigli. Il secondo autore (2) estende al bacillo del tifo alcune esperienze eseguite sul *b. subtilis* Ehrenberg, sbatte i germi in soluzione fisiologica di cloruro sodico, centrifuga e ottiene un liquido ricco di ciglia il quale iniettato nei conigli conferisce al loro siero di sangue un potere agglutinante specifico di valore quasi uguale a quello di un altro siero di un secondo coniglio iniettato coi corpi batterici privati del loro apparato ciliare. Ma le esperienze dei due autori ora ricordati si limitano alle osservazioni relative al potere agglutinogèno del materiale da essi adoperato, ed io non ho creduto di procedere con questo materiale allo studio della sua azione eventualmente immunizzante.

B) La profilassi coi mezzi di immunizzazione passiva.

Senza dare al termine di *immunità passiva* il valore che ad esso Ehrlich attribuisce, convinto invece, anche per esperienze da me personalmente eseguite (3), che questa denominazione vada applicata ad un genere di immunità acquisita che rappresenta una modalità della immunità attiva (Metchnikoff), dovrei riferire in questo capitolo sui mezzi adoperati per conferire artificialmente all'organismo animale e all'uomo, con sostanze immuni specifiche già elaborate, la immunità verso la infezione tifosa.

Ora da un lato, per ciò che riguarda le esperienze sugli animali, poichè quasi tutti gli autori che si sono occupati dello studio della

---

(1) Zeits. f. Hygiene, vol. XLVI, anno 1904, pag. 236 e seg.
(2) Arch. per le Scienze mediche, anno 1904, fasc. 1°.
(3) Riforma medica, anno 1905, n. 2-3. (Colgo questa occasione per dire, che per la sollecitudine con la quale — dietro mia preghiera — la redazione della « Riforma » provvedette alla pubblicazione di questo mio ora citato lavoro, non poterono, prima della pubblicazione stessa, essere mandate a me le bozze di stampa, ciò che è stato causa di non pochi errori nel testo, errori del resto di cui il lettore può fare facilmente giustizia da sè).

immunità attiva hanno potuto constatare in limiti maggiori o minori l'efficacia preventiva del siero di questi animali trattati con l'uno o con l'altro processo di immunizzazione, mi troverei per ciò stesso a dover ripetere gran parte di quello che nel precedente capitolo ho già esposto; e dall'altro lato fa d'uopo dire che la preoccupazione di ottenere un siero, o dei prodotti di valore terapeutico specifico, e lo sforzo di dimostrarne l'efficacia ha fatto del tutto trascurare lo studio della importanza di questi prodotti nella profilassi della malattia. Avrei dovuto quindi o peccare per eccesso e — senza considerevole utilità — dire e sperimentare molto, o peccare per difetto e dire e fare niente, partecipando al silenzio generale degli sperimentatori al riguardo. Ho creduto utile invece tenere una via di mezzo limitando la mia esposizione e le mie osservazioni in questo campo a quei prodotti immunizzanti adoperati più specialmente in vario tempo a scopo terapeutico nell'uomo, e che si possono dividere in due gruppi, di cui uno sarebbe principalmente costituito dal siero « antitossico » di Beumer e Peiper, dal siero della ditta Borroughs, Wellcome e C., dal siero di Chantemesse, e da quello dell'Istituto sieroterapico di Berna; e di cui l'altro sarebbe esclusivamente rappresentato dall'*estratto Iéz.*

Beumer e Peiper (1) partendo dal concetto che l'azione mortale della iniezione di tifo-culture negli animali da esperimento fosse dovuta non alla moltiplicazione dei germi nell'organismo infetto, cosa che essi credettero di poter dimostrare inesistente, ma all'azione tossica dei prodotti cellulari del batterio, ottenevano da un montone immunizzato con dosi crescenti di tifo-cultura un siero che essi chiamavano *antitossico*, del quale mezza goccia o una goccia al massimo bastava a proteggere il topo bianco dalla morte per inoculazione di una quantità sicuramente letale di virus, e che alla dose di 7-8 centesimi di centimetro cubico per 100 era capace di annullare nella cavia l'azione di quattro dosi mortali di cultura pura. Questo siero venne impiegato nell'uomo per conferirgli quella rapida immunità che avrebbe dovuto salvarlo dalla infezione in atto; gli effetti però che se ne sono avuti non sono stati molto incoraggianti, in quanto che risulta dalle osservazioni di Boerger (2) che su 12 malati di tifo in cui il siero fu adoperato in quantità anche di 150-200 cmc., in 8 non si ebbe alcun effetto utile sensibile, in 4 invece questa azione benefica non sarebbe stata da escludersi (ein Einfluss moglich) assolutamente. Il Borger conclude che dalle sue osservazioni risulta che il siero di Beumer e Peiper non è tossico anche se adoperato in forti dosi, e che *forse* non è da escludersi un benefico influsso sul corso della malattia nei casi lievi e trattati precocemente (non più tardi del 10° giorno).

(1) Zeits. f. klin. Med., 1895.
(2) Deut. medic. Wochens., 1896, p. 132.

Dei poco lodevoli effetti del siero di Beumer partecipa anche il siero antitifoso della ditta Wellcome.

Il Cowen (1), veramente, in due casi da lui trattati, facendo due iniezioni di siero di 3 cmc. ciascuna dopo aver visto intervenire circa tre ore appresso una elevazione di temperatura, dice che le condizioni generali, e la forza del corpo migliorano in modo sensibile. Altri autori però che hanno sperimentato con questo siero, come Cooper (2), Bokenham (3), ecc., dicono di aver avuto dei risultati terapeutici di scarso, o anche di discutibile valore.

Accennerò ancora ai tentativi rimasti tali di Cesaris-Demel e Orlandi (4) di impiegare alla cura del tifo un siero da loro ottenuto immunizzando gli animali indifferentemente con bacillo del tifo o con *b. coli*, a quelli di Klemperer e Levy (5) di curare l'infezione eberthiana dell'uomo con latte di capra artificialmente immunizzata, all'uso fatto da Hammerschlag (6) del siero di sangue di individui che hanno superato la malattia per curarne altri con la infezione in atto, siero destinato, a prescindere anche da ogni considerazione di efficacia, per la sua stessa origine, a non poter mai avere un largo impiego nella pratica, e passo quindi al siero di Chantemesse che per i risultati da esso dati merita di essere tenuto in speciale considerazione.

Lo Chantemesse servendosi prima del filtrato di una cultura di tifo fatta in una macerazione a freddo di milza e midollo osseo addizionata di sangue umano defibrinato, immunizzava con esso montoni e cavalli, animali assai sensibili all'azione della tossina, e presso i quali durante il periodo di immunizzazione si manifestavano fenomeni di paralisi e di cachessia che costringevano a procedere con grande circospezione nel trattamento immunizzante, e che facevano protrarre questo, di necessità, per un tempo assai lungo: così, ad esempio, un cavallo al quale già da 8 mesi si iniettavano dosi crescenti di tossina, ad una ulteriore iniezione di 60 cmc. di questa, reagiva ancora con una elevazione termica di 2 gradi (7). Più tardi (8) lo stesso autore communicava di aver sostituito al precedente terreno nutritivo una macerazione di milza allestita secondo il procedimento comunemente usato per la preparazione del brodo Martin, ottenendo su questo terreno nutritivo risultati ugualmente buoni sia per riguardo alla efficacia della tossina, come per quelli del siero dei cavalli con essa trattati, siero che tanto nel primo, come nel secondo caso ha dimostrato di essere dotato di cospicuo potere antitossico. Il siero è stato impiegato sull'uomo a scopo curativo, dove allorchè si interviene in tempo, e si amministra una congrua dose di siero, si vede già dopo 24-36 ore che la cefalea tende a scomparire, la diarrea comincia già a diminuire di

---

(1) The Lancet, 1899, p. 799, vol. II.
(2) Brit. med. Journ., 1897, vol. 1°.
(3) Brit. med. Journ., 1898, vol. 1°.
(4) Archiv. p. le scienze mediche, 1893, p. 279.
(5) Berlin. klin. Wochens., 1895, p. 601.
(6) Deut. medic. Wochens., 1893, n. 30.
(7) CHANTEMESSE. Comp. rendus de la Soc. de Biologie, 1897, p. 101.
(8) ID. Wiener medic. Blatter, 1898, p. 279.

intensità, la temperatura si eleva in primo tempo, ma poi dopo un tempo maggiore o minore a seconda la gravezza del male subisce un notevole abbassamento, il polso si rallenta, la pressione vasale si eleva. Con il suo siero nel 1902 (1) Chantemesse riferiva che erano stati trattati 507 casi di tifo e che fra essi si era avuta una mortalità solo del 6 %. Altre osservazioni sulla efficacia di questo siero sono state fatte in seguito e nel 1904 (2) questo autore riferisce che col suo siero Josias all'ospedale Brétonneau di Parigi e Brunon all'ospedale di Rouen hanno curato 220 bambini con soli 8 decessi, e che lui stesso in 3 anni e mezzo su 545 casi curati nel suo reparto all'ospedale del Bastione 29 a Parigi non ebbe che una mortalità del 4 %, mentre negli altri ospedali della città dal 1° aprile 1901 al 1° ottobre 1904 la mortalità era stata del 18 %. La gran cautela che bisogna avere, però, dice Chantemesse, nello impiego di questo siero deve essere quella dell'oblio da parte del medico di tutto ciò che comunemente si suole fare nei casi di intervento sieroterapico presso i difterici, e ricordarsi invece che quanto più è grave il caso, tanto più piccola deve essere la dose di siero da adoperare.

Di fronte alla importanza di questi risultati mi sono sentito in dovere di non trascurare in queste esperienze l'esame del siero Chantemesse dal punto di vista del suo potere profilattico, e dalla Direzione di questo laboratorio si è scritto due volte al prof. Chantemesse a Parigi per avere pochi centimetri cubici del suo siero. Alle nostre due lettere però non è stata data risposta alcuna, forse per disgraziati disguidi postali, giacchè se così non fosse male si spiegherebbe il perchè il prof. Chantemesse che pure lo ha generosamente concesso ai suoi due colleghi di Francia, non abbia poi creduto opportuno di far varcare al suo siero i valichi delle Alpi. Mancata la causa, di necessità è mancato l'effetto, e non potendo esperimentare con il siero Chantemesse, ho rivolto la mia attenzione al siero antitifico preparato dall'Istituto sieroterapico di Berna.

Esperienze di profilassi col siero di Berna. — E' un siero ottenuto da cavalli immunizzati, sotto la direzione del Tavel, per un periodo di tempo di 1-2 anni. Di esso un largo uso nella pratica non è stato ancora fatto, però Spirig (3) nel 1898 otteneva buoni risultati nella terapia del tifo con questo siero, Du Mesnil (4) di 5 tifosi trattati con quantità di 20-40 cmc. di siero non ne perdeva che uno, e Lanz e Kalt ugualmente ne hanno potuto constatare l'efficacia terapeutica. Non è stato ancora adoperato a scopo profilattico, tuttavia la Direzione dell'Istituto di Berna consiglia di adoprarlo a questo scopo nei casi di epidemia e sugli individui maggiormente esposti a contrarre l'infezione in dose di 10 cmc. Di questo siero si riferisce che ha un forte potere agglutinante: Du Mesnil lo ha visto dotato di un potere agglutinante di 1 : 10,000, e Lentz (5) dice che il suo valore sta specialmente nel suo alto potere agglutinante che si spingerebbe fino

(1) CHANTEMESSE. Presse Médicale, 1902, n. 103.
(2) ID. Presse Médicale, 1903, n. 86.
(3) Correspondenz beil. f. Schweiz. Aerzte, 1898, n. 13.
(4) Münch. medic. Wochens., 1902, n. 29.
(5) LENTZ, in KOLLE e WASSERMANN. Handb. d. pathog. Mikroorg., vol. IV, parte II, pag. 877.

ad una diluizione di 1 : 20,000 e più. Io però che per la gentilezza del dottore Carini ho potuto avere in esame circa 25 cmc. di questo siero, non ho potuto confermare tali dati, in quanto che fatte delle diluizioni del siero in soluzione acquosa 0.80 % di cloruro sodico a titoli successivamente crescenti da 1:50 a 1:10,000, distribuite le diverse diluizioni in altrettante provette in quantità di 1 cmc. per ciascuna di esse, stemperando in questo liquido una traccia di agar-cultura di tifo di 24 ore fino a renderlo leggermente opalescente, tenendo quindi i saggi alla stufa (37° C.) per 2 ore e osservando poi al microscopio in goccia pendente, non ho potuto rilevare positiva la reazione altro che nelle diluizioni del siero non superiori a un titolo di 1:300. La possibilità che il *fenomeno paradosso* abbia potuto trarmi in inganno non è da mettersi in campo per l'esito negativo avuto anche con le forti diluizioni, e d'altro canto l'osservazione non è tale da infirmare i risultati dei precedenti autori per il fatto che il dott. Carini inviando il siero a questo laboratorio avvertiva essere esso il residuo di uno stock di siero da lungo tempo preparato, cosa che rende plausibile la spiegazione che l'invecchiamento sia stato la causa del profondo scadimento del potere agglutinante del siero in esame.

Studiandone le proprietà battericide col metodo di Pfeiffer (Mischungrmeshode) ho potuto osservare quanto segue:

TABELLA XXVI.

Serie	Condizioni del siero al momento del suo uso	Numero d'ordine	Peso delle cavie	Proporzioni della miscela iniettata: siero — Cmc.	Proporzioni della miscela iniettata: cultura — Cmc.	Esito	Titolo del potere battericida del siero	Osservazioni
I Serie	Siero originario	Cavia 1ª	Circa 300 gm.	0. 01	1. 5	+	1 : 3,000	La quantità di cultura adoperata (brodo-cultura di 24 ore) corrisponde circa al doppio della D. M. L.
		» 2ª	»	0. 05	»	+	»	
		» 3ª	»	0. 10	»	—	»	
	Controllo	» 4ª	»	..	»	+	..	
II Serie	Siero originario inattivato al calore e poi addizionato di siero fresco di coniglio a parti uguali.	» 5ª	»	0. 001	»	+	1 : 30,000	
		» 6ª	»	0 005	»	+	»	
		» 7ª	»	0. 010	»	—	»	
		» 8ª	»	0. 050	»	—	»	
	Controllo	» 9ª	»	..	»	+	..	

Questa marcata differenza fra il potere battericida del siero allorchè viene adoperato così come ci viene dall'Istituto produttore, e quello dello stesso siero inattivato prima e poi riattivato con addizione di siero fresco normale, non si nota quasi affatto allorchè di tale siero si studia l'efficacia preventiva, cosa che costituisce ancora una prova di più — nel campo teorico — per dire come debba farsi una netta distinzione fra le due proprietà, e che rappresenta una costatazione di non lieve importanza nel campo pratico per dire come possa anche un siero privato in un modo qualunque — in questo caso col riscaldamento — del suo contenuto in citasi, mantenere quasi intatto il suo potere preventivo. Ciò risulta dalle seguenti esperienze che io ho già reso di pubblica ragione nel mio lavoro sulla « Maniera di azione di alcuni sieri antimicrobici, ecc. ».

TABELLA XXVII.

Qualità del siero adoperato	Peso delle cavie	Quantità di siero iniettato — Cmc.	Quantità di cultura iniettata dopo 24 ore	Esito	*Osservazioni*
Siero originario	Circa 300 gr. ciascuna	0. 01	2 D. M. L.	+	Come sempre per la infezione di prova delle cavie ho adoperato brodo-culture di 24 ore, iniettando la quantità voluta nel peritoneo.
		0. 03	»	—	
		0. 05	»	—	
		0. 10	»	—	
Siero originario inattivato a 58°.	Circa 300 gr. ciascuna	0. 01	»	+	
		0. 03	»	+ (r)	
		0. 05	»	—	
		0 10	»	—	
Siero originario inattivato come sopra e poi addizionato con siero fresco normale di coniglio a parti uguali.	Circa 300 gr. ciascuna	0.01 (0. 02)	»	+	
		0.03 (0. 06)	»	—	
		0. 05 (0. 10)	»	—	
		0. 10 (0 20)	»	—	
Siero originario inattivato come sopra e addizionato di siero fresco di coniglio normale in volume doppio.	Circa 300 gr. ciascuna	0. 01 (0. 03)	»	+	
		0. 03 (0. 09)	»	—	
		0. 05 (0. 15)	»	—	
		0. 10 (0. 30)	»	—	
Controlli	..	..	»	+	
	..	..	»	+	

Restando così in ogni caso fissata a $^{3}/_{100}$ di cmc. la quantità di siero che bisognava iniettare sottocute ad una cavia di 300 gr. per salvarla dalla infezione ad essa il giorno seguente conferita a mezzo della iniezione endoperitoneale di una dose di cultura certamente mortale per le cavie nuove, mi bisognava quindi vedere il tempo minimo necessario a che in seguito alla iniezione preventiva del siero lo stato immune si manifesti, e, una volta esso conseguito, quale è il periodo di sua durata. A questo scopo, e per la prima parte del quesito, otto cavie sono state tutte iniettate sottocute con 0.03 cmc. di siero ciascuna. Finita l'iniezione due furono infettate con il doppio della dose minima letale di brodo-cultura per la via del peritoneo, due altre lo furono egualmente dopo 6 ore; una terza coppia venne infettata dopo 24 e la quarta dopo 48 ore. E di queste cavie in circa 36 ore — con un ritardo di circa 12 ore sul controllo — morirono le prime due coppie, le altre sopravvissero, mettendoci per ciò stesso al caso di poter dire, che la iniezione della quantità minima immunizzante non giunge a spiegare nell'organismo della cavia la sua specifica azione prima che siano trascorse circa 24 ore.

Per riguardo poi al secondo lato del quesito dirò, che quattro cavie furono iniettate con ½ cmc. di siero ciascuna, e quindi infettate a diverso periodo di tempo; l'esito della esperienza è stato il seguente:

Tabella XXVIII.

	Peso delle cavie	Quantità di siero iniettato — Cmc.	Tempo decorso fra l'iniezione del siero e la infezione	Quantità di cultura iniettata	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª .	Fra 300 e 350 gr. ciascuna	0.50	7 giorni	2 D. M. L.	—	Ogni cavia immunizzata veniva infettata assieme ad una cavia nuova di controllo. La cavia 4ª è morta con un ritardo di quasi otto ore sul controllo.
» 2ª .		»	10 »	»	—	
» 3ª .		»	20 »	»	—	
» 4ª .		»	28 »	»	+	

Ciò posto, passo alla esposizione delle nostre cognizioni sull'unico rappresentante del secondo gruppo delle sostanze immunizzanti ora in esame e cioè all'estratto Iez, e delle mie esperienze riguardanti il suo valore profilattico.

Esperienze di profilassi coll'estratto antitifico di Iez. — Lo Ioz (1) era spinto alle sue indagini dall'azione antitossica che Brieger, Wassermann e Kitasato credettero di notare da parte della ghiandola timo sulla tossina del tifo. Iez, e, senza contare quanta differenza passi tra i costituenti chimici degli elementi cellulari della ghiandola morta, e i prodotti attivi della ghiandola in piena funzione vitale, dice di aver potuto indirettamente confermare le osservazioni di questi autori, in quanto che egli vedeva come degli animali con una ghiandola timo bene sviluppata fossero più resistenti alle infezioni microbiche di quello che altri animali in cui la ghiandola si presenta più piccola, o in tracce, o manca addirittura. La capacità inoltre degli elementi cellulari del sistema nervoso di fissare la tossina tetanica (Wassermann e Takaki), e l'ulteriore sviluppo della teoria delle « catene laterali » di Ehrlich, per cui la cellula sensibile toccata dal veleno affine si sarebbe in base alla legge di Weigert sopraccaricata di recettori, che è quanto dire di *antitossina in potenza*, data la deficiente azione antitossica degli umori circolanti di conigli immunizzati contro il tifo, determinava Iez a ricercare quali erano gli organi interni del coniglio più affini alla tossina tifosa, e a isolare da essi quella antitossina che si mostrava tanto deficiente nel siero di sangue. Si servì a questo scopo come di organi più utili, seguendo in ciò fare il concetto di Wassermann che negli animali sopravvissuti a infezione da tifo-bacillo il midollo osseo, la milza, i gangli linfatici e il timo racchiudono specifiche sostanze protettive, si servì, dico, lo Iez della ghiandola timo, milza, midollo osseo, midollo spinale e cervello di conigli che avevano ricevuto per iniezione pochi centimetri cubici di brodo-cultura di tifo (circa cmc. 8 in due iniezioni). Questi organi venivano spappolati ed emulsionati in una mescolanza di soluzione fisiologica di cloruro sodico, alcool, glicerina, piccole quantità di pepsina e di acido fenico; il tutto veniva tenuto 24 ore in ghiacciaia e quindi filtrato. Questo estratto è privo di proprietà agglutinanti e battericide specifiche, ma sarebbe però dotato della proprietà di fissare la tossina tifosa (l'autore non ci dice il perchè di questa sua affermazione). Iniettato nei conigli in dose di cmc. 3-5 poche ore prima, o contemporaneamente ad una dose certamente mortale di brodo-cultura, impedisce a questi animali di contrarre l'infezione, e somministrato a cucchiai per la via del tubo digerente nell'uomo tifoso, in dose di cmc. 300-400, su tre casi dall'A. riferiti, si sono avute tre guarigioni.

L'estratto è stato sperimentalmente studiato da Markl (2), il quale più che vere proprietà antitossiche, dice che esso solo possiede delle proprietà battericide, le quali pare che sarebbero anche di minore entità di quelle possedute dal siero di sangue dei conigli, dai cui organi l'estratto è stato ottenuto.

In clinica ha dato però, per quello che ne hanno scritto Eichorst (3), Esslinger (4), Casardi (5), Pometta (6), lo stesso Iez (7) dei buoni risultati.

---

(1) Wiener medic. Wochens., 1899, p. 345.
(2) Wiener Klin. Wochens., 1902, n. 2.
(3) Correspond. f. Schweizerärzte, 1902, p. 439 e 641.
(4) *Beh. d. Abdominaltyphus m. d. Antityphus. - Extract v. Dr. Iez* - Zurich, 1901.
(5) Gazz. d. ospedali e delle Cliniche, a. 1903, n. 35.
(6) Wiener klin. Wochens., 1901, nn. 28 e 46.
(7) Wiener klin. Wochens., 1902, n. 8.

Io con una boccetta da cmc. 200 di estratto, acquistato all'Istituto siero-terapico di Berna, ho istiuito le esperienze di cui ora terrò parola.

Quattro cavie furono iniettate sotto cute con quantità progressivamente crescenti di estratto da 1 a 6 cmc. Il giorno appresso in tutte fu riscontrato un edema al punto di inoculazione di diversa importanza, edema che in progresso di tempo, in due sulle quattro cavie iniettate, si risolvette con la ulcerazione dei tegumenti avvenuta fra il 6° e il 7° giorno. Ciò mi indusse ad attendere ancora qualche tempo, e solo in 10ª giornata le quattro cavie furono infettate per la via del peritoneo, assieme ad un controllo, con una quantità sicuramente mortale di brodo-cultura. L'esperienza ha avuto il seguente esito:

TABELLA XXIX.

	Peso delle cavie	Quantità di estratto iniettato — Cmc.	Reazione locale	Quantità di cultura iniettata dopo 10 giorni — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª .	Circa 300 grammi ciascuna	1	Edema	0. 50 %	+	La dose minima letale della brodo-cultura adoperata è uguale a cmc. 0. 40 %.
» 2ª .		2	Id.	»	—	
» 3ª .		4	Edema e ulcerazione	»	—	
» 4ª .		6	Id.	»	—	
Controllo .		—	..	»	+	

Pare, quindi, che spetti all'estratto Iez, in effetti, un indiscutibile potere immunizzante, il quale, però, stando al concetto da cui parte l'autore nella sua preparazione, allo stesso modo come con un siero immune specifico, dovrebbe comparire rapidamente negli animali con esso trattati. Ora a questa concezione, della maniera di azione del liquido in esame, non mi permette di sottoscrivere la esperienza che ora riferirò.

Quattro cavie, dato che una quantità di 2 cmc. si era per la precedente esperienza dimostrata capace di proteggere l'animale dalla infezione, sono state tutte contemporaneamente iniettate con 2 cmc. di estratto sotto cute, ed inoculate con brodo-cultura di tifo in diverso tempo, assieme ai relativi controlli, da 24 ore a nove giorni appresso l'avvenuta iniezione della sostanza vaccinante. Il risultato è segnato nella seguente tabella:

TABELLA XXX.

	Peso delle cavie	Quantità di estratto iniettato — Cmc.	Tempo decorso fra l'iniezione dell'estratto e la infezione	Quantità della cultura infettante	Esito	*Osservazioni*
Cavia 1ª.	Circa 350 grammi ciascuna	2	24 ore	2 D. M. L.	+ (*a*)	Il segno (*a*) indica che la cavia è premorta al controllo.
» 2ª.		2	3 giorni	id.	+ (*a*)	
» 3ª.		2	7 giorni	id.	—	
» 4ª.		2	9 giorni	id.	—	

Evidentemente, quindi, se l'estratto Iez conferisce agli animali da esperimento una certa immunità contro l'infezione tifosa, questa immunità non comparisce rapidamente come dovrebbe avvenire nel caso che si trattasse di una vera immunità passiva, ma ha bisogno di un certo tempo per stabilirsi, quel tale *tempo di reazione* che è caratteristica necessità della immunità attiva. In questo senso, però, dovremmo sostituire al concetto di Iez che nel suo estratto si trovano delle sostanze immuni specifiche estratte dagli organi di loro maggiore formazione, l'altro concetto che, dato il nesso intimo fra sostanze attive dei germi e anticorpi relativi, in quegli organi ove più attiva è la formazione di questi anticorpi, maggiore deve essere l'afflusso delle sostanze attive specifiche, le quali — si può immaginare — passando nel liquido di macerazione adoperato da Iez, a questo liquido potrebbero eventualmente conferire quelle proprietà immunizzanti che ad esso nelle ultime riferite esperienze abbiamo visto pertinenti.

Se così fosse però, adoperando il tanto comune procedimento delle successive iniezioni negli animali a dosi crescenti, dovremmo assistere alla comparsa nel siero di questi di sostanze immuni specifiche in quantità sempre e progressivamente crescenti.

Con questo criterio io ho trattato un coniglio per un periodo di 30 giorni, con iniezioni successive di estratto Iez, in dosi crescenti da 5 a 10 cmc., giungendo a iniettare in tutto — sottocute prima e poi per via endoperitoneale — 35 cmc. di estratto. Prima che queste iniezioni fossero state cominciate, il coniglio avea subito un modico salasso per la carotide, e del siero ottenuto fu saggiato il potere agglutinante e il potere battericida, e per l'uno potei stabilire che il siero si mostrava attivo fino a un

titolo massimo di 1:25, per l'altro potei assicurarmi che era necessario non meno di cmc. 0.8 di siero per salvare una cavia di gr. 300 dalla contemporanea iniezione di una quantità mortale di brodo-tifo-cultura (1.1 D.M.L.).

La prima iniezione di estratto fu fatta al coniglio il 30 agosto u. s., e il giorno 5 settembre salassato per la marginale dell'orecchio l'animale, e saggiato il potere agglutinante del suo siero, la prova eseguita fra diluizioni di 1 : 25 a 1 : 200 riuscì negativa. Le iniezioni furono continuate; il 18 settembre nuovo salasso per la marginale, nuovo saggio del potere agglutinante del siero nelle proporzioni ora cennate, e nuovo esito negativo.

Il 29 settembre il coniglio viene svenato. La titolazione del potere agglutinante del siero, eseguita con diluizioni da 1 : 25 a 1 : 2000, affine di evitare l'errore in cui avrebbe potuto farmi cadere l'eventuale intervento del fenomeno paradosso, mi permise di constatare che solo ad una diluizione di 1 : 25 il microscopio poteva rivelare l'inizio nella miscela di saggio della formazione di piccoli gruppetti di 6-10 batteri ciascuno nel liquido. E per riguardo al potere battericida, il dosaggio eseguito col metodo di Pfeiffer, usando come nel caso precedente la cultura in brodo come mezzo di infezione, mi permise di fissare a 0.5 cmc. la quantità di siero necessaria a salvare una cavia di gr. 300 infettata con una dose mortale di brodo-cultura.

Se quindi con l'estratto Iez non è possibile parlare del conferimento agli animali di immunità passiva, non possiamo, per quanto ora ho esposto, neanche attribuirgli la proprietà di immunizzare attivamente; o meglio, come non si può asserire, che in esso esistano preformati degli anticorpi immuni, così non si può neanche ammettere che in esso si trovino delle aptine o, in genere, delle sostanze specifiche attivamente immunizzanti. Ora — per quanto vorrei escludere da questo lavoro ogni discussione teorica — non posso esimermi di fronte a questa strana condizione di cose dall'accennare brevemente all'unica spiegazione plausibile che a me sembra possa darsi del fatto, e cioè che, nel caso della immunità conferita coll'estratto Iez, noi ci troviamo di fronte ad un caso di immunità da *istone*.

Il fatto osservato da Schmidt, e poi studiato da Dorpart, Foà e Pellacani, dell'azione tossica, che con l'intermediario della distruzione di leucociti e piastrine, spiega sull'organismo animale la introduzione di protoplasmi eterogenei, azione tossica che si manifesta con caduta della pressione sanguigna, stato comatoso e nei casi cronici con disturbi della funzione intestinale, dimagramento e marasma; l'osservazione che dai corpi e dalle culture di germi specifici di malattie schiettamente setticemiche come la

pneumococcemia, il carbonchio, il tifo, non si sono potuti estrarre che veleni scarsamente attivi, induceva il Carbone (1) al sospetto che questi tali germi cagionassero la malattia e la morte, meno per azione di veleni primari, e più invece per l'azione di veleni secondari liberatisi in conseguenza della distruzione di elementi cellulari dell'organismo infettato. Ne conseguiva, nel concetto di questo autore, che per rendere immune un animale contro una di queste infezioni bisognava pure renderlo insensile all'azione di questi veleni secondari, fra cui, a suo dire, speciale considerazione meritano il *nucleo-istone* e i suoi prodotti di decomposizione, l'*istone* sopratutto.

E in effetti osservava che, in seguito alle iniezioni di piccole quantità di istone nei conigli la loro sensibilità alla infezione pneumococcica dapprima aumentava, ma nei giorni successivi veniva man mano a crescere la resistenza. fino allo stabilirsi (verso il 15º giorno) di un vero e proprio stato immune, il quale, però, non solo non aumenta ma accenna a scadere per successive iniezioni di istone. Con lo streptococco, col carbonchio, col tifo ha avuto risultati quasi analoghi. L'immunità conseguita sarebbe una semplice immunità *antitossica*.

Ora l'istone, che secondo Kossel (2), il quale per il primo lo ha isolato dai globuli rossi delle anitre, sarebbe un proteoso. e che Lilienfeld (3), il quale lo ha isolato dal nucleo-istone della ghiandola timo, per il fatto che esso è coagulabile al calore ritiene come un corpo intermedio fra le proteine coagulabili e i proteosi, in una sua modificazione è solubile in acqua, e potrebbe quindi passare — data la maniera di sua preparazione — nell'estratto Iez, conferendo a questo quelle proprietà immunizzanti che tanto bene si accordano con i fatti osservati da Carbone e ora citati.

In tutti i modi, dopo aver fatto rilevare come malamente si assegnino a questo prodotto caratteri di sostanza passivamente immunizzante, sia quale si voglia la sua maniera di agire, per il compito assunto, a me basta di aver dimostrato come la iniezione di una certa quantità di estratto Iez, al pari di tanti altri prodotti batterici specifici, può essere di presidio efficace contro una infezione che sopravvenga, però, ad una certa distanza dalla avvenuta iniezione; chè se poi la infezione sopraggiunge poco dopo che l'estratto è stato iniettato, in questo caso, per come risulta dalla esperienza riferita nella tabella XXX, quello che si nota è semplicemente la indiscutibile azione predisponente dell'estratto stesso per cui viene a morte ancora prima del controllo la cavia con esso iniettata. Non è invece spiccatamente marcata l'*azione adiuvante* della dose di estratto riconosciuta come

---

(1) Gazzetta medica italiana, 1902, n. 7. e Riforma medica, a. 1902, vol. Iº, p. 733.
(2) Arch. f. Physiol., a. 1891, p. 182-186.
(3) Zeits. f. Physiol. Chemie., vol. XVIII, p. 473.

minima utile a scopo profilattico: di due cavie, difatti, infettate per la via del peritoneo con $^2/_3$ della D. M. L. di brodo-cultura e poi una subito dopo e l'altra dopo 24 ore iniettate sottocute con 2 cmc. di estratto, nessuna venne a morte, per quanto la prima mostrasse per qualche giorno segni di manifesta sofferenza.

Breve è, poi, la durata dello stato immune conferito con questa sostanza: due cavie iniettate con 2 cmc. di estratto sotto-cute e infettate con brodo-cultura per la via del peritoneo 26 giorni appresso morirono entrambe per setticemia tifica in meno di 48 ore.

C) Vaccinazioni col metodo Besredka.

Alla immunizzazione attiva dell'uomo o degli animali contro le malattie infettive, anche se fatta con culture morte, o coi prodotti batterici, un triplice appunto viene fatto, e cioè di dar luogo a fenomeni di reazione generali e locali che assumono tutto l'aspetto e l'importanza di una fastidiosa e anche non breve malattia; di aver bisogno, perchè lo stato immune si assodi, di un periodo di tempo di 5, 10, 15 giorni, durante il quale l'individuo resta alla mercè della infezione eventualmente sopravveniente; di rendere infine l'individuo più recettivo alla infezione durante il tempo di reazione e di eccitare l'attecchimento e lo sviluppo di una infezione latente, la quale, magari, avrebbe potuto coi mezzi propri di resistenza dell'organismo venire più o meno facilmente domata. Ed è su questo terzo appunto, per cui verrebbero ad essere dichiarate pericolose le vaccinazioni eseguite su individui specialmente esposti alle cause infettanti, che, a ragione, con maggiore intensità, è stata richiamata l'osservazione degli studiosi, specie per ciò che riguarda le vaccinazioni più largamente usate, le antipestose. Così, Salimbeni e Calmette (1) studiando la efficacia del vaccino Haffkine a Oporto facevano rilevare tutta la verità di questo fatto e tutto il timore che dovea necessariamente conseguire alla dimostrazione di tale verità, con la osservazione che dei ratti i quali erano stati infettati con dosi di cultura di peste dimostratesi inefficaci a far contrarre a dei ratti di controllo una mortale infezione, morivano di peste se in pari tempo alla coltura infettante si iniettava anche la dose abituale di vaccino. Bannermann (2) credette di poter contraddire alle osservazioni sperimentali di Calmette e

(1) An. de l'Inst. Pasteur, 1899, p. 905.
(2) Central f. Bakter. Orig., vol. XXX.

Salimbeni coi dati statistici della mortalità fra i vaccinati e i non vaccinati contro l'infezione pestosa, ma i dati da lui riferiti non sono di tal natura da poter convincerci che l'esperienza della clinica invalidi l'esperienza del laboratorio, e si è cercato quindi di porre un rimedio a questo grave inconveniente con l'uso delle così dette *vaccinazioni simultanee*, cioè delle iniezioni contemporanee di siero immune e di vaccino, a mezzo delle quali si sarebbe — almeno in teoria — raggiunto lo scopo di addizionare gli effetti preventivi dei due mezzi impiegati, ottenendo nell'individuo così trattato la rapida comparsa della immunità, la sua lunga durata, la diminuzione di intensità della reazione locale e generale propria del vaccino, l'abolizione del pericolo rappresentato dalla ipersensibilità acquisita durante il periodo di reazione; si sarebbero cioè accoppiati i vantaggi della immunizzazione passiva ed attiva eliminandone i rispettivi pericoli ed inconvenienti.

Il metodo era stato per la prima volta adoperato da Kolle e Turner (1) nelle vaccinazioni contro la peste bovina, più tardi lo fu da Leclainche (2) contro il mal rosso dei suini, e contro la peste bubbonica dopo Calmette e Salimbeni (*l. c.*), esso venne adoperato su 47 persone a Kobe e Osaka da Kitasato, Takaki, Sigha e Moriya (3) e su 194 individui a Napoli nel 1901 (4) per quanto in quest'ultimo caso la iniezione del siero e del vaccino non fosse stata del tutto contemporanea.

Egli è però da notare come debba effettivamente sembrare strano che possa spiegare una qualsiasi azione che abbia carattere di attività una mescolanza di sostanze che devono ritenersi come antagoniste fra di loro, per le quali dovremmo ammettere una reciproca neutralizzazione portante ad un prodotto finale perfettamente inattivo.

Nè la supposizione può essere ritenuta gratuita in quanto che Roux e Nocard (5) facevano osservare, ad esempio, che l'inoculazione di virus della peripneumonite dei bovini e di siero immune specifico non dà nessuna reazione è vero, ma non conferisce neanche l'immunità; ed ed io stesso in una piccola esperienza eseguita ho avuto dei risultati che pare diano alla supposizione ora avanzata sostegno di realtà. Due conigli vennero iniettati con 5 cmc. ciascuno, per la marginale dell'orecchio, di brodo-tifo-cultura sterilizzata a 60° C. e quindi dopo 6 giorni furono salassati. Di essi però uno quasi assieme alla iniezione della cultura aveva ricevuto anche la iniezione di 3 cmc. di siero immune specifico; ebbene, provato il potere agglutinante del siero di sangue del coniglio trattato con sola cultura esso si mostrò attivo fino a una dilui-

---

(1) Zeitf. f. Hygiene, 1898, vol. XXIX, p. 309.
(2) Revue vétérinaire, 1900, 1° giugno.
(3) Rel. d. epid. di peste a Kobe e Osaka. Tokio, 1900.
(4) Santoliquido. Rel. al Cons. sup. di sanità sui casi di peste bub. a Napoli nel 1901,
(5) *Le microbe de la péripneumonie*. Paris, 1900.

zione di 1 : 250, l'altro invece anche usato in una diluizione di 1 : 25 dette risultato negativo.

Il Beiranowych (1), però, faceva già prima notare come fatti di tal genere nel caso delle siero-vaccinazioni pur essendo possibili potevano essere eliminati bene stabilendo le proporzioni delle rispettive quantità del siero e del vaccino da adoperare e affermava « che l'attitudine di elaborare l'immunità attiva e la durata di essa sono in ragione inversa della quantità di siero iniettata prima della inoculazione dei bacilli ». A questa legge di proporzionalità, nel caso della peste bovina, — dopo che Kolle a Turner (*l. c.*) già avevano fatto notare che l'uso del siero e del virus deve essere bilanciato in modo da avere una reazione nell'animale vaccinato senza la quale lo stato immune non si raggiunge — si sottoscricono Memmo, Martoglio e Adani (2), i quali riconoscono la necessità di una certa proporzione tra virus e siero suggerendo di adoperare come dosi utili 40 cmc. di siero immune di fronte a cmc. 0. 4 di virus di bue che è più attivo, e solo 10 cmc. di siero di fronte a cmc. 0. 4 di virus di pecora, che è meno attivo del precedente.

Inoltre ora è qualche anno anche Pfeiffer e Friedberger (3) in uno studio relativo al concetto della virulenza dei germi, fra l'altro sperimentalmente osservavano che l'azione immunizzante di $^{1}/_{10}$ di patina di agar-cultura di vibrione del colera era ancora permessa quando questi germi venivano iniettati assieme a 0. 005 cmc. di siero immune specifico, ma veniva del tutto ostacolata quando la quantità di siero si faceva salire a 0. 1-0. 5 cmc. Sarebbe quindi evidente, secondo Besredka, che l'eccesso di siero immune, nel caso delle vaccinazioni simultanee, può portare alla conseguenza che i microbi assieme ad esso iniettati attraversino l'organismo animale senza che questi ne conservi il più piccolo ricordo.

E ad evitare nel loro insieme questi inconvenienti, egli (4) suggerisce un metodo che, sperimentato nei suoi particolari per il bacillo della peste, abbozzato in linea generale per il bacillo del tifo e per il vibrione del colera, dà effettivamente, è bene dirlo, dei risultati meravigliosi. Egli adopera come materiale vaccinale delle masse bacillari sensibilizzate, con un procedimento che è inutile che io ripeta in quanto che risulterà da quello che sto per dire relativamente a delle esperienze di vaccinazioni col vaccino Besredka, preparato fedelmente con le norme da lui indicate.

Dieci culture di tifo su agar solidificato a becco di clarino, culture di 24 ore, vengono emulsionate in circa 10 cmc. di soluzione fisiologica di cloruro sodico, e versate quindi dolcemente in una grossa provetta nella quale in precedenza erano stati introdotti 20 cmc. di siero-tifo (5). Il siero aveva un potere agglutinante di 1 : 3500, e l'emulsione dei

(1) Arch. d. sciences biolog., vol. VI, f. 3, 1898.
(2) Questi Annali, 1904, p. 295.
(3) Berliner klin. Wochens., 1902, p. 585.
(4) Besredka. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1902, p. 918.
(5) Questo siero è stato ottenuto da una capra immunizzata col filtrato di essudato peritonale di cavie infette col bacillo di Eberth.

batteri rimaneva nella provetta al disopra di esso in uno strato distinto. Siero ed emulsione, così in contatto per i loro strati terminali, venivano lasciati al termostato a 37° per 24 ore di seguito, trascorso il quale tempo grosse masse batteriche erano — per l'avvenuto agglutinamento — precipitate al fondo della provetta. Il liquido soprastante era accuratamente decantato, e il deposito stemperato ogni volta in nuova soluzione fisiologica veniva centrifugato per due, tre volte di seguito allo scopo di eliminare ogni più piccola traccia di siero. I corpi batterici così lavati, furono stemperati in soluzione fisiologica di cloruro sodico e tenuti per un'ora a 60°, dopo di che erano pronti per l'uso. Ora, quali sono gli effetti che seguono alla iniezione di questo vaccino negli animali?

Innanzi tutto esso iniettato alla dose di 2 cmc. sotto-cute alle cavie, in una dose cioè quasi corrispondente alla quantità di batteri contenuti in due patine di agar-cultura, nond à luogo a nessuna reazione nè locale, nè generale: le cavie tenute in osservazione per 2-3 giorni di seguito non mostrano sul posto della iniezione nessuna traccia del trattamento subìto, e la temperatura rettale non ha mai sorpassato i 38° 2 - 38°. 5 mantenendosi quindi in limiti pressochè normali. Una cavia invece iniettata sotto-cute con una sola cultura su agar di 24 ore dello stesso campione di tifo servito alla preparazione del vaccino Besredka, già dopo 24 ore, oltre ad una cospicua elevazione di temperatura (40°. 3), mostra forte edema al punto di inoculazione, edema che più tardi si risolve con la formazione di un piccolo ascesso e ulcerazione della cute. Evidentemente le cellule batteriche fissando l'anticorpo specifico contenuto nel siero immune con cui sono state tenute a contatto, al modo stesso con cui dei fiocchi di fibrina impregnati di *enterokinasi* (1) vengono disciolti da una soluzione di tripsina là dove invece rimangono insoluti dei fiocchi della stessa fibrina non messi a contatto in precedenza con questo importante fermento del tubo intestinale (2), le cellule batteriche, dico, così sensibilizzate, inglobate e agevolmente digerite dai fagociti, mancano di produrre quella azione locale necrotica che invece rimanendo a lungo inassorbiti *in situ* producono sui tessuti circostanti, con quella proteina altamente necrotizzante nel loro corpo contenuta che è la nucleina, gli altri batteri, per quanto in quantità minore introdotti sotto-cute senza essere stati in precedenza sensibilizzati. Sotto l'azione della sostanza intermediaria, le favorite condizioni di digestione intra-cellulare dei corpi batterici (Metchnikoff) de-

(1) Delezenne. Ann. de l'Inst.Pasteur, 1901.
(2) Chépowalnikoff. *Fisiologia del succo intestinale.* Pietroburgo, 1899.

vono indurre una rapida e profonda modificazione della nucleina batterica relativa, in quanto che è possibile constatare se non la scomparsa certo una profonda attenuazione degli effetti della leucolisi che le ordinarie culture morte, col suo intervento, sogliono produrre. Difatti se a due conigli, come io ho fatto, si iniettano nelle vene a ciascuno quattro culture uccise di bacillo del tifo, se si è avuto cura di sensibilizzare in precedenza i corpi dei germi in uno dei due conigli iniettati, il giorno appresso iniettando nel circolo sanguigno ai due animali nucleina di blastomiceti, il coniglio trattato con culture sensibilizzate muore con un impiego di 5 cg. di questa nucleina, mentre ne bastano solo 3 cg. per uccidere il coniglio iniettato con culture non sensibilizzate. Ora, tenendo conto che, come ho in altra occasione dimostrato, tutte le nucleine batteriche e con esse anche quelle dei blastomiceti spiegano azione mortale sull'organismo animale per disfacimento di leucociti, liberazione di *plasmasi* e conseguente coagulazione intravascolare del sangue, data ancora la constatazione eseguita che la nucleina ha potere cumulativo, poichè ad uccidere un coniglio già prima inoculato con culture sensibilizzate è necessaria una quantità maggiore di nucleina di quella necessaria ad uccidere un altro coniglio iniettato come il precedente con la stessa quantità di culture non sensibilizzate, ne risulta necessaria la conseguenza che nel primo caso la rapida digestione dei corpi batterici denatura la nucleina in essa contenuta privandola di quel potere leucolitico che costituisce il fondamento della sua azione nociva.

Altra proprietà essenziale del vaccino Besredka è di evitare quello stato di ipersensibilità vaccinale che si manifesta negli animali vaccinati durante il tempo di reazione, e data l'importanza di questo fattore nel giudizio di valore dei vari metodi di immunizzazione attiva artificiale non mi pare un fuor d'opera l'esporre come un tale fatto possa venire spiegato.

L'Ehrlich ammette liberi in circolo nell'organismo animale una quantità di corpi *batterio-tropici* o di *parziali-corpi-immuni* i quali si distaccherebbero dagli elementi cellulari dell'organismo stesso sotto l'azione della maggiore o minore attività del ricambio materiale, e sarebbero dotati di specifica affinità verso le più svariate forme cellulari batteriche. Tra essi si troverebbero — nel caso nostro — anche dei corpi *tifo-tropici*, i quali, pervenuta una certa quantità di bacilli del tifo nell'organismo, si fissano ad essi, li mettono nell'ambito di azione della citasi, e ne inducono la distruzione, eliminando in tal modo — qualora il loro numero non è eccessivo — il pericolo di una infezione (immunità fondamentale di Ehrlich). Per tale fatto però, mentre da un canto l'organismo ipercompensa con una nuova e più rigogliosa emissione il numero delle sostanze batterio-

tropiche impegnate, ciò che costituisce quella teoria con frase scientificamente poetica detta da Ehrlich « del flusso e riflusso e della marea montante della immunità », dall'altro lato vi sarebbe per esso un certo periodo di tempo — proprio quello che intercede fra la fissazione dei corpi immuni, parziali ai batteri, o ai loro prodotti specifici e la messa in libertà di nuovi corpi immuni — durante il quale con la diminuita quantità di questi corpi specifici l'organismo si trova ad avere diminuita per quanto temporaneamente la sua provvista in atto di mezzi di lotta, e se una nuova invasione di germi interviene in questo periodo di tempo l'animale vaccinato si troverà di fronte ad essi più sprovvisto e perciò meno forte di un animale nuovo che possiede ancora liberi i suoi corpi batteriotropici; il primo sarà più sensibile alla infezione che non il secondo.

E' vero, però, che questi corpi immuni, questi fissatori si trovano liberi in circolo? Bordet (1) mescolando due sieri nuovi provenienti da specie animali differenti, ha potuto constatare qualche volta la presenza di fissatore in uno di essi, in quanto che vedeva come, ad esempio, il vibrione del colera il quale non è distrutto dal siero di cavallo e da quello di cavia adoperato partitamente, è invece trasformato in granuli allorchè lo si sottopone all'azione combinata di questi due sieri; e Moxter (2) inattivando un siero normale al calore e poi addizionandolo di qualche goccia di essudato peritoneale di cavia osservava anche lui la trasformazione in granuli del vibrione del colera sottoposto alla influenza di questa miscela.

Metchnikoff (3) propenderebbe piuttosto ad ammettere che il fissatore come la citasi non si trovi libero in circolo, ma sia un costituente intracellulare dei fagociti degli animali nuovi; il fatto però che l'iniezione di bacilli del tifo sensibilizzati sopprime il periodo di ipersensibilità vaccinale depone a favore della teoria di Ehrlich e con essa si presta ad essere facilmente spiegato.

Introducendo difatti nell'organismo animale dei bacilli trattati col procedimento di Besredka, noi veniamo ad introdurvi dei germi i cui recettori cellulari sono già stati in precedenza saturati col loro fissatore affine, cosicchè una volta che essi sono giunti in circolo si trovano in condizione di non poter più fissare nuove sostanze batterio-tropiche; queste, dirò così, rimangono nell'animale vaccinato nella stessa quantità in cui esse si trovavano già prima dell'arrivo della massa batterica vaccinante, e mentre questi spiegano la loro azione eccitando gli elementi cellulari alla iperproduzione di corpi immuni, restano le prime sul campo, nella loro interezza, pronte a spiegare per conto loro quella azione difensiva ad esse normale ove in questo periodo di tempo una specifica infezione fosse per sopraggiungere.

L'asserzione, poi, di Besredka che il suo vaccino non dà luogo a nessun periodo di ipersensibilità dell'animale verso la corrispondente infezione, è dimostrata esatta oltre che dalle sue, anche dalle seguenti

(1) An. d. l'Inst. Pasteur, 1899, pag, 295.
(2) Central. f. Bakter., vol. XXVI, a. 1899, p. 344.
(3) *L'Immunité d. les mal. infect.* Paris, 1901, p. 213.

esperienze. Due cavie sono state iniettate nel cavo peritoneale con $^{1}/_{3}$ della D. M. L. di brodo-cultura di tifo, e contemporaneamente una di esse riceve sotto-cute la iniezione di una cultura, l'altra la iniezione di due culture di tifo su agar uccise e sensibilizzate. Le due cavie sono sopravvissute, mentre due altre cavie inoculate nello stesso modo e con le medesime quantità di culture, non sensibilizzate però, sono morte per setticemia tifica in meno di 24 ore.

L'esito della esperienza è per se stesso, riguardo all'intento con cui essa era fatta, dimostrativo; bisognava però suffragarla con la dimostrazione — importante per la pratica delle vaccinazioni — se cioè la dose di cultura sensibilizzata dimostratasi incapace a spiegare una manifesta azione predisponente alla infezione, fosse poi una dose utilmente vaccinante.

Ma la seguente esperienza istituita a scopo di stabilire un controllo di efficacia del vaccino Besredka, dà alla esperienza precedente questo appoggio necessario: — Sei cavie sono state iniettate sotto-cute con quantità diverse di culture sensibilizzate ed emulsionate in soluzione fisiologica, e 24 ore dopo, constatata l'assenza di qualsiasi traccia di reazione locale e generale, tutte vengono infettate assieme ad un controllo con iniezioni nel cavo peritoneale di una quantità mortale di brodo-cultura. L'esperienza è proceduta nella seguente maniera:

Tabella XXXI.

	Peso delle cavie	Quantità di vaccino iniettato — Cmc.	Reazione locale	Temperatura dopo 24 ore	Quantità di cultura iniettata dopo 24 ore	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia . . .	Fra 270 e 310 grammi.	4	Assenza di ogni traccia di edema.	38°.4	2 D. M. L.	—	Il vaccino era preparato in modo che ogni 2 cmc. di esso contenevano i germi morti e sensibilizzati di una cultura su agar.
2ª » . . .		3		38°.5	id.	—	
3ª » . . .		2		38°.2	id.	—	
4ª » . . .		1		38°.4	id.	—	
5ª » . . .		0.5		38°.0	id.	+	
6ª » . . .		0.1		38°.2	id.	+	
7ª » . . .		..		..	id.	+	

Con i quali risultati, mentre si viene da un lato a confermare la asserzione di Besredka, che, cioè, col suo vaccino lo stato immune si stabilisce già infra le 24 ore successive alla sua iniezione, dall'altro, richiamandosi all'esito avuto dalla precedente esperienza, ci mette in grado di affermare che una quantità di questo vaccino anche superiore alla dose minima immunizzante non abbassa i poteri di resistenza dell'animale da esperimento permettendo ad esso di vincere l'azione dei germi infettanti iniettati in quantità per se stessa non mortale, nel modo stesso in cui l'avrebbe vinta se il vaccino non fosse stato iniettato.

E da questo punto di vista non mi è parso inutile aggiungere alle precedenti una nuova esperienza, condotta nel modo seguente. Tre cavie sono state iniettate sotto-cute con 2 cmc. di vaccino, e quindi una subito dopo, un'altra dopo 6 ore, una terza dopo 10 ore sono state iniettate per via intraperitoneale con la semplice dosa minima letale di brodo-coltura. Contemporaneamente a ciascuna di queste tre cavie altre tre nuove di controllo furono infettate con la stessa dose di cultura, ciò che mi permise di notare come nessuna delle cavie vaccinate sia premorta al rispettivo controllo; l'ultima di esse, anzi, dopo aver avuto segni manifesti di sofferenza, si è salvata.

Quanto dura l'immunità così conferita? Quattro cavie iniettate sotto-cute con 3 cmc. di vaccino ciascuna, dopo uno, due, tre, quattro mesi dalla avvenuta vaccinazione sono state infettate per la via peritoneale con una volta e mezza la dose minima letale di brodo-cultura: e mentre i rispettivi controlli sono morti infra le 24 ore, tutte le cavie vaccinate si sono salvate, cosa che permette di affermare che lo stato immune conferito alla cavia da una iniezione di 3 cmc. di vaccino Besredka (1 ½ cultura su agar) si mantiene per un periodo di tempo che va oltre i quattro mesi.

Avrei potuto a questo punto, assodata l'indiscutibile efficacia del vaccino in esame, chiudere questa parte delle mie esperienze; ma poichè dal lavoro di Besredka appare come egli non abbia eseguito indagini per constatare se e in che proporzioni dopo la iniezione del vaccino antitifico e anticoleroso, nel sangue dell'animale vaccinato compariscono specifiche sostanze immunizzanti, così ho proceduto a studiare il potere preventivo e battericida eventualmente acquistato dal siero di sangue di animali trattati con la iniezione di una dose riconosciuta efficace di vaccino.

Riferirò a questo riguardo quanto ho potuto osservare col siero di una cavia iniettata sotto-cute con 3 cmc. di vaccino e svenata il giorno appresso.

Quattro cavie furono iniettate nel cavo peritoneale ognuna con una dose sicuramente mortale di brodo-tifo-cultura addizionata rispettivamente di quantità decrescenti di questo siero da 0.1 a 0.001 di cmc.; un controllo fu inoculato con la sola brodo-cultura, e la esperienza ebbe l'esito seguente:

TABELLA XXXII.

	Peso delle cavie	Quantità di siero adoperato — Cmc.	Quantità di cultura adoperata — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia . . .	Circa 300 gr. ciascuna.	0.1	0.50 %	—	D. M. L. della brodo-cultura adoperata per infettare le cavie = cmc. 0.40 %.
2ª » . . .		0.5	id.	—	
3ª » . . .		0.01	id.	—	
4ª » . . .		0.001	id.	+	
Controllo. . .	..	..	id.	+	

Però eseguito in tal modo il metodo di Pfeiffer per la ricerca del potere battericida di un siero supposto immune, quando manca la prova di controllo, quando cioè non si è sperimentato se — come nel caso nostro — il siero in esame provoca la batteriolisi al titolo cui è stato impiegato solo sul bacillo del tifo e non su altri germi, potrebbe anche nascere il sospetto che la sua constatata attività fosse in funzione più dell'eventuale aumento di citasi, e meno dell'aumento della sostanza fissatrice.

Ora è qualche anno, difatti, Enea (1) servendosi di iniezioni in dosi varie nei conigli di nucleina di b. del tifo e di b. sottile, vedeva sotto l'azione di questa sostanza aumentare considerevolmente il potere battericida *in vitro* del siero di sangue degli animali trattati senza che perciò a tale fatto potesse attribuirsi carattere alcuno di specificità.

Del quale carattere solo allora potremo essere sicuri quando della esistenza in esso di una cospicua quantità di sensibilizzatrice si è avuta

(1) Riforma medica, 1903, n. 47.

la dimostrazione indiscutibile. Il metodo fin'ora in uso a questo proposito è quello di Bordet e Gengou (1) fondato sulle conoscenze che noi abbiamo in rapporto all'azione dei sieri emolitici, e di questo metodo consigliano l'impiego a scopo diagnostico, nei casi dubbi, Widal e Le-Sourd (2). Esso però per quanto è preciso altrettanto è complicato, mentre di più facile applicazione, e per gli studi sulla batteriolisi, più diretto allo scopo, è quello di recente adoperato da Stern e Korte (3) col quale si rende possibile, in vista della ricerca della sensibilizzatrice, non solo una analisi biologica qualitativa, ma anche e sopratutto una vera analisi quantitativa. Io ho applicato questo metodo allo studio del potere battericida specifico del siero di cavia che era già stato in precedenza, per come ora ho esposto, provato col metodo di Pfeiffer, e ho proceduto — seguendo i dettami dei due autori ricordati — nel modo seguente:

Fatte successive diluizioni del siero in esame in soluzione fisiologica, diluizioni spinte da 1 : 1,000 a 1 : 5,000,000, introdotto un centimetro cubico di ognuna di queste diluizioni in altrettante provette, queste vengono per un'ora mantenute a 60° a bagno-maria e dopo raffreddamento si addiziona al liquido esistente in ogni provetta 0.5 cmc. di una diluizione al decimo di siero fresco normale di coniglio in soluzione fisiologica, e 0.1 cmc. di una diluizione al titolo di 1 : 5,000 in soluzione fisiologica di una brodo-cultura di tifo di 24 ore (4). La mescolanza viene lasciata in termostato a 37° per 4 ore, dopo di che si versa in ogni provetta circa 10 cmc. di agar-nutritivo fuso e mantenuto a 45°, si agita, e si versa in scatole di Petri.

In pari tempo si allestiscono due scatole di controllo, di cui una (controllo I) contiene stemperato nell'agar $^{1}/_{10}$ di cmc. della diluizione della cultura adoperata, l'altra (controllo II) contiene la mescolanza di tale quantità di cultura e di ½ cmc. della diluizione di siero fresco impiegato per la reattivazione, mescolanza stemperata anch'essa nell'agar come tutte le precedenti, assieme alle quali viene per 48 ore mantenuta al termostato a 37°. Trascorso questo tempo l'azione battericida spiegata dal siero viene rilevata a colpo d'occhio dal paragone che si fa tra la quantità di colonie sviluppatesi nella scatola denominata « controllo I » e quelle sviluppatesi nelle scatole allestite con batteri, siero in esame inattivato a 60° e siero fresco; e il paragone fra la quantità di colonie svilpppatesi in queste scatole e quelle sviluppatesi nella scatola con cultura e solo siero fresco (controllo II) ci permette di valutare e distin-

---

(1) An. de l'Inst. Pasteur, 1901, p. 289.
(2) Soc. méd. des Hôpitaux, 14 giugno 1901.
(3) Berl. klin. Wochens., 1901.
(4) Gli autori adoperano ½ cmc. di questa diluizione; ma il numero enorme di batteri che con tale quantità di liquido vengono impiegati, ostacolano la efficacia del paragone fra le diverse scatole di Petri.

guere la diminuzione del numero dei batteri dovuto alla semplice citasi del siero fresco da quella dovuta alla azione combinata di questa citasi e della sensibilizzatrice — se c'è — del siero in esame, sensibilizzatrice di cui quanto più grande è la quantità tanto più elevato sarà il titolo della diluizione del siero immune col quale si avrà potuto constatare una evidente diminuzione nel numero delle colonie.

Così procedendo, dalla esperienza eseguita ho avuto i seguenti risultati.

TABELLA XXXIII.

Titolo della diluizione del siero di cavia esaminato (1 cmc.)	Quantità di siero di coniglio normale (diluizione 1 : 10) — Cmc.	Quantità di cultura adoperata (diluizione 1 : 5,000) — Cmc.	Sviluppo di colonie nelle scatole dopo 48 ore di incubazione		
			Siero immune + siero fresco + cultura	Siero fresco + cultura	Cultura sola
1 : 1,000	0.5	0.1	+ + +	+ + +	+ + +
1 : 5,000	»	»	+ + +	..	..
1 : 10,000	»	»	+ +	..	..
1 : 25,000	»	»	—	..	..
1 : 50,000	»	»	—	..	..
1 : 100,000	»	»	—	..	..
1 : 150,000	»	»	+	..	..
1 : 300,000	»	»	+	..	..
1 : 500,000	»	»	+ + +	..	..
1 : 1,000,000	»	»	+ + +	..	..
1 : 2,000,000	»	»	+ + +	..	..
1 : 5,000,000	»	»	+ + +	..	..

NB. Il segno — indica l'assenza totale di sviluppo.
» + » lo sviluppo di poche colonie.
» + + » lo sviluppo di molte colonie.
» + + + » lo sviluppo di una quantità innumerevole di colonie.

Possiamo quindi dire, in base a questi risultati, che con la iniezione del vaccino Besredka si eccita l'organismo della cavia vaccinata alla iperproduzione di ambocettori — carattere essenziale di specificità — ai quali si deve, da un lato, il manifestatosi cospicuo potere

battericida del siero (1: 100,000 — 1: 300,000), e con la cui presenza in eccesso, causa della *deviazione del complemento*, potremmo spiegarci, secondo dicono Neisser e Wechsberg (1) quel *fenomeno paradosso* da essi per i primi notato, e nel caso ora in esame intervenuto, per il quale si scorgono più batterioliticamente attive le medie diluizioni e non le forti nè le deboli diluizioni del siero.

Una ultima esperienza ho quindi eseguito relativa al potere profilattico di questo siero. A tale scopo quattro cavie furono iniettate sottocute con dosi di siero progressivamente decrescenti da 0.5 a 0.01 cmc., e il giorno appresso vennero infettate per via intraperitoneale con una dose mortale di brodo-cultura; l'esito avuto dalla esperienza è stato il seguente:

TABELLA XXXIV.

	Peso delle cavie	Quantità di siero iniettato — Cmc.	Quantità di cultura iniettata dopo 24 ore — Cmc.	Esito	*Osservazioni*
1ª cavia . . .	Circa 300 grammi.	0.5	0.45 %	—	La dose minima letale della brodo-cultura adoperata era uguale a cmc. 0.35 %.
2ª » . . .		0.1	id.	—	
3ª » . . .		0.05	id.	+ (r)	
4ª » . . .		0.01	id.	+	
5ª » (controllo)		..	id.	+	

In conseguenza di ciò si può dire che l'impiego, in dose opportuna, delle culture sensibilizzate col metodo Besredka, immunizza le cavie contro l'infezione tifosa, e conferisce al loro siero di sangue specifiche proprietà battericide e profilattiche.

(1) Münch. medic. Wochenschrift, 1901.

III. — RIEPILOGO E CONCLUSIONI GENERALI.

Giunto così al termine di queste osservazioni sperimentali, cercherò di ritornare brevemente sul cammino percorso per dedurne quelle conseguenze che, per la pratica della profilassi del tifo addominale, sembrano di maggiore importanza.

Così dirò come data l'importanza del contagio e la molteplicità dei mezzi di trasmissione di questa perniciosa malattia, non si può scindere in una utile lotta contro il diffondersi di essa l'impiego delle ordinarie misure di igiene generale dall'uso di una profilassi specifica, la quale si rende sopratutto indispensabile là dove, come per le popolazioni rurali e gli eserciti in campo, l'applicazione delle buone norme dell'igiene è destinata a rimanere un pio desiderio. La dimostrata efficacia delle vaccinazioni antitifiche nell'uomo è spinta considerevole a migliorarne gli effetti col migliorare i metodi e la qualità del materiale da adoperare, miglioramenti però che male si potrebbero giudicare dalle proprietà che con l'uno o l'altro metodo vengono conferite al siero di sangue dei vaccinati. Il fondarsi sulla semplice constatazione del potere battericida del siero non può essere ritenuta ragione sufficiente per ammettere che questo stato immune sia stato raggiunto, quando tale constatazione è fatta direttamente col sangue dell'uomo o dell'animale trattato, in quanto che per esso noi non possiamo discernere la parte che nel fenomeno spetta all'aumento della citasi — che si può ottenere senza bisogno di un trattamento specifico — da quella che spetta all'aumento della sensibilizzatrice. Chè, difatti, servendoci dell'esame del potere battericida del siero di sangue direttamente noi potremmo, come nel caso in cui si iniettano 4 cmc. di vaccino di Wright in una cavia, dichiarare solidamente immune un animale che non lo è, e viceversa ammettere come non immunizzati animali che essenzialmente lo sono, caso dimostrato dal fatto che il siero di sangue di una cavia sicuramente vaccinata con estratto di Shiga ha dato un siero di cui $^1/_{10}$ di cmc. non è stato capace di impedire la morte di una cavia iniettata con una dose mortale di tifo-cultura (metodo di Pfeiffer).

Da questo lato invece, per quanto il Metchnikoff sia di opinione contraria, pare che maggiore affidamento, nel caso nostro, potrebbe dare lo studio del potere preventivo del siero, il quale, come nel caso dell'impiego del vaccino di Wrigt, si è mostrato di maggior valore nella cavia iniettata con 2 cmc. di vaccino e immunizzata, di quello

che non nella cavia iniettata con 4 cmc. di vaccino e rimasta sensibile alla infezione.

Data però la via ora seguita per giudicare della efficacia dei vari mezzi di immunizzazione, io non mi sono indugiato su più ampie esperienze al riguardo, dappoichè, per il compito assuntomi, avevo sotto mano un mezzo più semplice e più probatorio, e precisamente quello di vedere come si comportavano, di fronte alla infezione, animali in precedenza trattati con l'uno o l'altro processo di immunizzazione.

Le esperienze a questo riguardo eseguite (1), le quali sono tanto più concludenti in quanto che sono state tutte eseguite sul medesimo genere di animali e col medesimo campione di tifo mantenuto ad una virulenza quasi costante, mi portano a queste due prime e sommarie conclusioni:

1° *Si sono dimostrati inefficaci a vaccinare rapidamente la cavia contro la infezione tifosa, la tossina dei Werner, quella di Rodet, Lagriffoul e Walhy e l'estratto di Brieger e Mayer.* Ciò non contradice però alla azione immunizzante che i rispettivi autori hanno creduto di poter dimostrare come posseduta dalle sostanze da essi adoperate, in quanto che tale azione — come io stesso ho visto per la tossina di Rodet — si può rendere manifesta in seguito a ripetute iniezioni, o potrebbe magari meglio mettersi in evidenza adoperando, per la preparazione della sostanza vaccinante germi ancora più virulenti (Wassermann) di quello da me adoperato.

2° *Tutti gli altri materiali specifici adoperati (vedi l'annesso quadro riassuntivo), in quantità maggiore o minore, riescono a proteggere sicuramente la cavia dalla infezione tifosa.*

Di questi ultimi già due possono essere proscritti dall'impiego sull'uomo, e dico precisamente delle culture vive, siano esse attenuate o virulente, giacchè indipendentemente da ogni altro disturbo locale e generale a cui essi portano, è sempre da mettere in prima linea il grave pericolo di poter con esse trasmettere all'uomo quella infezione da cui lo si vuole premunire. Il carattere della resistenza ai germi patogeni, difatti, è un carattere assai relativo; e se noi riusciamo con l'affaticamento corporeo, col digiuno, coi forti abbassamenti di temperatura, ecc., a rendere recettivi ad una data infezione quegli animali che pure verso di essa, come carattere di razza, vengono ritenuti in genere naturalmente immuni, a maggior ragione è da temere che una

(1) A fine di poter avere rapidamente sott'occhio i risultati di tutte le esperienze da me eseguite, ne ho raccolto e sinteticamente esposti i risultati nella tab. XXXV posta in fine al lavoro.

qualunque di queste cause deprimenti possa, in date circostanze, abbassare così profondamente i poteri organici di resistenza di un essere recettivo al tifo come l'uomo, da far riuscire infettante la introduzione in esso di germi che per la loro quantità, o per la loro scarsa virulenza potrebbero, per la maggior parte degli altri individui, essere ritenuti come innocui.

Resterebbero quindi come utilizzabili le culture morte e i prodotti ottenuti dalle culture del bacillo del tifo (includendo fra essi l'estratto Iez, il di cui modo di comportarsi lo fa ascrivere ad un posto speciale più vicino ai mezzi di immunizzazione attiva, anzichè a quelli di immunizzazione passiva), i quali tutti però hanno già un primo difetto per la reazione locale e generale a cui essi, entro limiti maggiori o minori, dànno ugualmente luogo. Questa reazione locale che va dall'edema forte seguito da ulcerazione (tossina di Chantemesse) fino al' lieve che rapidamente senza altra conseguenza si riassorbe (estratto di Shiga), questa reazione generale che si manifesta con una ipertermia di diversa intensità (38°. 2-41°. 2), si potrebbero in gran parte evitare con l'impiego dell'essudato peritoneale filtrato o della nucleo-albumina sospesa in acqua scaldata, o con l'uso dell'estratto di Macfadyen e Rowland. Ma per riguardo al primo di questi mezzi, io devo fare notare che spesso un gran numero di animali devono essere sacrificati per avere una quantità utilizzabile di materiale, in quanto che non sempre le cavie infettate dànno un abbondante rendimento di essudato peritoneale, e che la tossicità di questo estratto, anche a parità di tutte le condizioni di sua preparazione, non è mai costante ed è difficilmente dosabile, circostanze che circondano il vaccino di tali difficoltà tecniche da renderlo poco idoneo a un largo uso nella pratica. Resterebbero gli altri due, l'estratto di Macfadyen e la tifo-nucleo-albumina di cui a preparare il primo è necessario tutto un macchinario speciale, e alla preparazione della seconda un impiego costoso di materiale nutritivo e di reagenti (l'alcool sopratutto). Ciò sarebbe del resto un difetto trascurabile di fronte al vantaggio che noi potremmo effettivamente sopprimere con l'impiego della nucleo-albumina scaldata, quella fase di malattia iniziale che è comune e che si rimprovera a tutti i mezzi di immunizzazione attiva. Ma con ciò non le avremmo tolto però l'altro grave difetto, anch'esso a tutti questi mezzi comune, di avere, cioè, bisogno di un tempo più o meno lungo per conferire l'immunità, e di spiegare una più o meno decisa azione predisponente verso una infezione specifica eventualmente sopravveniente, e adiuvante verso una infezione già in atto. Al pari quindi di tutti questi mezzi — nei quali, se in qualche caso queste due ultime dannose azioni

non si sono dimostrate all'esperienza, ciò può essere messo in conto della dose di vaccino adoperata, non sufficientemente elevata — al pari di essi, dico, la tifo-nucleo-albumina deve cedere il passo al *vaccino di Besredka il quale mentre ha, coi mezzi di immunizzazione passiva comune il merito di determinare uno specifico stato immune entro il breve termine di 24 ore, si presenta poi come il migliore dei mezzi di immunizzazione attiva sperimentati, per il fatto che non dà luogo a nessuna reazione nè locale nè generale, non spiega azione nè predisponente nè adiuvante e conferisce agli animali una immunità che supera, in durata, quella con tutti questi mezzi ottenuta.*

TABELLA XXXV.

Materiale adoperato	Esito delle esperienze relative alla prova di efficacia	Quantità riconosciuta necessaria	Reazione locale	Temperatura rettale delle ca[illegible] 24 ore dopo l'[illegible] del material[illegible] in esame
Brodo-cultura viva e virulenta (D. M. L. = 0. 30 %).	positivo	0. 5–1 cmc.	Edema seguito da ulcerazione della cute	40°. 5–41°
Brodo-cultura viva attenuata (sviluppo a 40° per 3 giorni).	id.	3–5 cmc.	Id.	40°–41°. [illegible]
Vaccino di Pfeiffer e Kolle.	id.	un'ansa di patina di agar cultura	Edema non seguito da ulcerazione della cute	40°. 2–41°
Vaccino di Wright e Semple.	id.	0. 5–2 cmc.	Id.	39°. 9–4[illegible]
Tossina di Chantemesse.	id.	2–4 cmc.	Edema seguito da ulcerazione della cute	40°. 8–4[illegible]
Tossina di Werner.	negativo	..	..	..
Tossina di Rodet, Lagriffoul e *Valhy*	id.	..	..	..
Essudato peritoneale filtrato.	positivo	0. 1–1 cmc. (?)	Edema non seguito da ulcerazione della cute	38°. 7-3[illegible]

ro riassuntivo.

Durata « tempo azione »	Durata dello stato immune	Esito delle esperienze relative all' azione		*Osservazioni*
		predisponente	adiuvante	
giorni	..	..	..	
giorni	..	..	..	
giorni	2 mesi	negativo	negativo	Il titolo del potere battericida del siero di sangue di una cavia immunizzata con questo vaccino è di 1 : 300; il titolo del potere preventivo si eleva invece fino a 1 : 3,000.
id.	4 mesi	*positivo* (solo nel caso però in cui la dose di vaccino iniettata è portata a 4 cmc.)	*negativo*	Elevando la dose di vaccino da 2 a 4 cmc. la cavia soccombe alla iniezione infettante. Il siero di sangue di una cavia iniettata con 1 cmc. di vaccino ha un potere battericida che si eleva fino ad un titolo di 1 : 600; quello di una cavia iniettata con 4 cmc. di vaccino va fino ad un titolo di 1 : 3,000. Il potere profilattico dei due sieri raggiunge per il primo un titolo di 1 : 3,000, per il secondo un titolo inferiore a 1 : 600.
0 giorni	..	..	negativo	
..	.	..	..	
..	..	..	..	Gli animali trattati con questa tossina resistono alla infezione se la tossina è iniettata nel peritoneo, o se si fanno di essa due iniezioni successive.
0 giorni	..	..	..	Le quantità utili vaccinanti di filtrato sono poco esattamente ponderabili.

ISTITUTO D'IGIENE SPERIMENTALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Sul fenomeno della agglutinazione spontanea di alcuni batteri nelle soluzioni saline

per il dottor **MARIO LEVI DELLA VIDA**, assistente.

Nelle prove di agglutinazione che spesso si fanno sui germi del gruppo tifo-coli, sia a scopo diagnostico col siero di malati, sia a scopo di studio col siero di animali immunizzati, molte volte mi è accaduto di trovare, già dopo ½-1 ora agglutinazione evidente così nel tubetto ove alla emulsione batterica era stato aggiunto il siero da saggiare, come nel tubetto di controllo.

Questo fatto che costantemente si ripeteva allorchè facevo le prove col *b. paratyphi B* (Schottmüller) mi parve degno di studio, da un lato per ovviare ad un inconveniente che non poteva a meno di rendere malagevole e incerta la prova dell'agglutinazione; dall'altro per studiare un fenomeno che avrebbe potuto gettare qualche luce sulla questione, sempre oscura, del meccanismo della agglutinazione.

Il *b. paratyphi B* è di uno stipite proveniente dall'Istituto di Kràl, non molto virulento ma che cresce sempre rigoglioso nei successivi passaggi che ad intervalli di pochi giorni si fanno nei comuni terreni di coltura.

Il metodo seguito nel nostro Istituto per studiare l'agglutinazione è quello di Kolle e Pfeiffer, che adopera cioè emulsioni di agarcoltura in soluzione al 0.85 % di Na Cl; orbene, in queste condizioni ho sempre potuto constatare che le emulsioni del *b. paratyphi B* alle quali non era

stata aggiunta alcuna traccia di siero agglutinante presentavano dopo poco tempo nettissimo il fenomeno della agglutinazione; fenomeno che nè con l'esame macroscopico nè con l'osservazione microscopica in goccia pendente e in preparati colorati si poteva in alcun modo distinguere dalla agglutinazione provocata con l'aggiunta di un siero specifico.

Fin dal 1896 in seguito agli studi di Blachstein (1) e di Engels (2) sull'azione agglutinante della crisoidina per i vibrioni colerici si è incominciato a parlare di agglutinazione da sostanze chimiche. A Malvoz (3) si deve lo studio dell'agglutinazione provocata da molte sostanze chimiche, studio confermato ed ampliato dai successivi lavori di Beco (4), di Bossaert (5), da quello di Sobrazès e Brengues (6) in cui vi è un lungo elenco di sostanze agglutinanti, e da quello di Altobelli e Memmo (7) nel quale è studiata l'azione esercitata sulle emulsioni di alcuni batteri da vari sali, da acidi e da alcali.

Però mentre tutti gli autori riconoscono la importanza che nel fenomeno della agglutinazione ha il cloruro di sodio; mentre in molti lavori si parla di stipiti di batteri spontaneamente agglutinantisi; non ho trovato nella letteratura alcuno studio dettagliato sul potere di alcuni batteri di dare una agglutinazione spontanea nei liquidi contenenti cloruro di sodio che comunemente si adoperano per studiare le proprietà antigene dei sieri. Anzi nel recentissimo e completo studio di Paltauf (8) sull'agglutinazione, è scritto (pag. 776): « Na Cl, welches normale Bakterien in keiner Koncentration zu fällen vermag...... ecc. ».

***

Come ho detto più sopra una prima questione da risolvere era quella di potersi servire del *b. parathyphi B* per le prove siero-diagnostiche, senza incorrere nell'inconveniente di avere nel tubo di controllo

---

(1) *Verhalten des Chrysoidins gegen Choleravibrionen.* Münchener medicinische Wochenschrift, 1896.

(2) *Die Diagnose der Vibrionen mit Hilfe des Chrysoidins.* Centrbl. f. Bakt., ecc., I Abth., Bd. XXI, 1897.

(3) *Agglutination par des substances chimiques.* Annales de l'Institut Pasteur, XI, 1897.

(4) *Note sur la valeur de l'agglutination par le sérum antityphique expérimental comme moyen de diagnostique entre le bacille d'Eberth et les races côliformes.* Ctbl. f. Bakt., ecc., I Abth., Bd. XXVI, 1899.

(5) *Etude sur l'agglutination comparée de vibrion cholérique et des microbes voisins par le sérum spécifique et par les substances chimiques.* Annales de l'Institut Pasteur, XII, 1898.

(6) *Agglutinines chimiques.* C. R. de la Société de biologie de Paris, nov. 1899.

(7) *Sul fenomeno dell'agglutinazione.* Giornale medico del R. Esercito, gennaio 1902.

(8) *Die Agglutination.* Handbuch der pathogenen Mikrorganismen. von Kolle und Wassermann, Jena, 1903, Bd. IV, Kap. XII.

un'agglutinazione identica a quella che si osservava nel tubo dove si doveva studiare l'azione del siero.

Ho voluto perciò assicurarmi se il fenomeno dell'agglutinazione spontanea era dovuto al batterio, oppure al liquido ambiente.

Ho saggiato colture ottenute su diversi terreni, e cioè colture in agar al quale erano stati aggiunti idrati di carbonio, colture in brodo di cavallo, in brodo di vaccina, in brodo lattosato e glucosato.

Per le prime facevo con la solita tecnica una emulsione della patina in acqua fisiologica: per le altre filtravo le brodocolture e raccolti sul filtro i corpi batterici li emulsionavo nella soluzione di Na Cl. L'osservazione, dopo vari intervalli di tempo durante il quale i tubi erano mantenuti in termostato, era sempre macroscopica.

Con queste varie prove ho dimostrato *che il* b. paratyphi B. *si agglutinava con la stessa facilità qualunque fosse stato il terreno di coltura dal quale esso proveniva.*

L'età della coltura è anche senza influenza alcuna sulla produzione del fenomeno. Ho allestito colture in agar quotidianamente per la durata di 30 giorni ed ho quindi preparato 30 tubetti con 1 cmc. di soluzione di Na Cl al 0. 85 %: in ognuno ho emulsionato due anse normali delle colture di varie età. Dopo un'ora si osservava nei 30 tubi l'agglutinazione altrettanto manifesta e altrettanto progredita.

Nasceva il dubbio che la proprietà di agglutinarsi fosse legata alla scarsa virulenza del germe esaminato. Ho fatto perciò 5 passaggi successivi nel corpo della cavia del *b. paratyphi B*, ottenendone in ultimo un germe che nella quantità di mezza patina in agar uccideva, iniettato sottocute, una cavia del peso di 250 gm. circa nello spazio di 24 ore.

La emulsione della coltura di questo batterio così esaltato nella sua virulenza, si è agglutinata nello stesso tempo che nei tubi di controllo la emulsione del germe originario.

Ma vi ha di più. La proprietà di agglutinarsi spontaneamente in una soluzione fisiologica di Na Cl non solo è indipendente dal terreno sul quale è cresciuto il microrganismo, dall'età della coltura, dalla virulenza di esso; *ma è anche indipendente dalla vitalità del germe stesso.* Mi sono convinto di questo fatto con le seguenti prove.

Fatte due colture in agar ed emulsionate le patine in poca acqua distillata, da una parte ho ucciso i germi con il cloroformio, dall'altra con il calore (+100 C° per la durata di 30'). Raccolti i batteri mercè la centrifugazione ho emulsionato così i primi come i secondi in un cmc. di soluzione di Na Cl al 0.85 %. Dopo poco più di mezz'ora nel tubetto contenente i germi uccisi col calore vi era netta agglutinazione; questa era parimenti

netta dopo poco più di un'ora anche nell'altro tubetto; dopo 12 ore in entrambi il liquido era completamente limpido con precipitato al fondo.

Escluso adunque che nel fenomeno dell'agglutinazione spontanea i microrganismi avessero una parte attiva, bisognava studiare come si potesse far variare il fenomeno col mutare il liquido nel quale erano emulsionati i batteri. A tal'uopo preparai cinque tubetti e posi nel primo 1 cmc. di soluzione di Na Cl al 0.85 %, nel secondo 0.90 cmc. d'acqua fisiologica e 0.10 cmc. di soluzione N/10 di idrato sodico, nel terzo 1 cmc. d'acqua distillata, nel quarto 1 cmc. di brodo comune, nel quinto 1 cmc. di siero di coniglio nomale. In ciascuno dei tubi ho emulsionato 4 mgr. di patina su agar del *b. paratyphi B*.

Ecco riassunto il risultato delle osservazioni dopo vario periodo di tempo:

TABELLA I.

	30 minuti	1 ora	2 ore	24 ore
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.85 % + 2 anse *b. paratyphi B*	+	++	+++	precipitato
0.90 cmc. Na Cl al 0.85 % + 0.10 soluzione N/10 Na oH + 2 anse *b. paratyphi B*	—	—	—	—
1 cmc. acqua distillata + 2 anse *b. paratyphi B*	—	—	—	—
1 cmc. brodo comune + 2 anse *b. paratyphi B*	+	+++	precipitato	precipitato
1 cmc. siero coniglio normale + 2 anse *b. paratyphi B*	+	+++	»	»

Dalla tabella risulta dunque che *mentre non si ha agglutinazione nell'acqua distillata, si ha evidente in tutti quei liquidi che contengono cloruro di sodio; e che d'altra parte una certa quantità di idrato sodico inibisce il fenomeno in una soluzione salina dove di solito suole avvenire.*

E' da notarsi ancora che se nel tubo contenente emulsione del *b. paratyphi B* in H^2O distillata, e nel quale non vi è traccia di agglutinazione, si aggiunge dopo 24 ore gm. 0.0085 di Na Cl, l'agglutinazione spontanea ben presto compare evidente.

Poichè si è veduto che l'aggiunta di un alcali impediva la formazione di aggruppamenti batterici nella soluzione di cloruro sodico, na-

sceva spontaneo il sospetto che il *b. paratyphi B* a contatto del cloruro sodico desse luogo alla produzione di sostanze acide, e a queste si dovesse il fenomeno dell'agglutinazione: è noto infatti come gli acidi siano fra le sostanze chimiche di quelle che provocano facilmente l'agglutinazione.

Ho istituito quindi questa prova: in un tubo ho posto alcuni cmc. di soluzione di cloruro sodico al 0,85 % e vi ho emulsionato il *b. paratyphi B*; ho aggiunto quindi una goccia di una soluzione alcoolica di fenolftaleina all' 1 % e tante goccie di NaOH fino ad avere una netta colorazione rosa. Per controllo ho ripetuto lo stesso procedimento in un secondo tubo contenente, invece del *b. paratyphi*, il *b. typhi Eberth*.

Osservati i due tubi dopo varî intervalli di tempo si nota che nel secondo tubo l'emulsione si è mantenuta uniformemente torbida; il liquido dopo 24 ore è completamente scolorato: nel primo tubo invece è avvenuta dopo breve tempo agglutinazione completa con rìschiaramento del liquido e precipitato al fondo; eppure ancora dopo 72 ore persiste la netta colorazione rosa.

Da questa esperienza si deve concludere che *il fenomeno dell'agglutinazione spontanea, pure essendo legato alla presenza di cloruro sodico, non è determinato dalla eventuale produzione di sostanze acide che si formino in presenza del cloruro sodico stesso.*

E' noto per le esperienze di Bordet (1) e per quelle successive di Joos, (2) la grande parte che ha il cloruro di sodio nel fenomeno della agglutinazione: questa non avviene nella assenza completa di Na Cl, e avviene male se ne esistono soltanto piccole tracce. Quindi per lo scopo pratico che mi ero prefisso, di adoperare cioè per la prova sierodiagnostica col *b. paratyphi B* delle emulsioni dove non avvenisse la agglutinazione spontanea, era poco conveniente l'uso di una emulsione in acqua distillata, e tanto meno di una emulsione a cui fosse stata aggiunta dell'idrato sodico, che, come dirò appresso ha una azione che si oppone anche alla agglutinazione con sieri specifici. Ho saggiato pertanto il comportamento del *b. paratyphi B* emulsionato in soluzioni di Na Cl di titolo diverso.

Ecco riassunti i risultati ottenuti:

---

(1) *Mécanisme de l'agglutination.* Annales de l'Institut Pasteur, XIII, 1899.

(2) *Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination.* Zeitschrift für Hygiene, Bd. XXXVI, 1901; ibid. Bd. XL, 1902.

TABELLA II.

	15 minuti	30 minuti	1 ora	2 ore	6 ore
1 cmc. acqua distillata + 2 anse *b. paratyphi B*	—	—	—	—	—
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.10 % + 2 anse *b. paratyphi B*	—	—	—	—	—
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.20 % + 2 anse *b. paratyphi B*	—	—	—	—	—
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.30 % + 2 anse *b. paratyphi B*	—	—	—	±	±
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.40 % + 2 anse *b. paratyphi B*	—	±	+	+++	+++
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.50 % + 2 anse *b. paratyphi B*	±	+	+++	+++	precipitato
1 cmc. soluz. Na Cl al 0.75 % + 2 anse *b. paratyphi B*	+	++	+++	+++	..
1 cmc. soluz. Na Cl. all'1.0 % + 2 anse *b. paratyphi B*	±	+	++	+++	..

Si può quindi conchiudere che l'*agglutinazione spontanea del* b. paratyphi B *avviene in quelle soluzioni di cloruro sodico, nelle quali il titolo è superiore al 0.30 %; non avviene mai nelle soluzioni al 0.20 %* *e in quelle di titolo inferiore; trova le condizioni più favorevoli nelle soluzioni fatte intorno al 0.75 %.*

Era interessante vedere se l'agglutinazione dei microrganismi mercè l'azione di un siero specifico si potesse compiere adoperando le emulsioni batteriche in soluzione di Na Cl al 0.20 %, anzichè quelle in soluzione al 0.75-0.85 %.

Ho fatto perciò delle prove con un siero di coniglio immunizzato col *b. paratyphi B*, mercè tre inoculazioni sottocutanee alla distanza di 7 giorni; e con siero di coniglio immunizzato fortemente col *b. typhi*. Ho saggiato l'azione del siero, in varie diluizioni, nel primo caso sopra un'emulsione del *b. paratyphi* in soluzione di Na Cl al 0.20 %, nel secondo caso sopra emulsioni di *b. thypi* in soluzioni al 0.10, 0.20, 0.40, 0.75 % di Na Cl.

Ecco il risultato di queste prove:

TABELLA III.

	30 minuti	1 ora	6 ore	24 ore
Siero di coniglio immunizzato col *b. paratyphi B* nel rapporto di:				
1 : 100	+++	precipitato	..	..
1 : 500	+++	»	..	..
1 : 1000.	+	+++	precipitato	..
1 : 2000	—	±	++	++ (precipit.)
1 : 5000.	—	—	±	± (precipit.)
1 : 7500.	—	—	—	—
B. paratyphi B in soluzione Na Cl 0,75%	+++	+++	precipitato	..
Id. id. 0,20%	—	—	—	—

TABELLA IV.

Siero tifo agglutinante nel rapporto di	Soluzione Na Cl del titolo	1 ora	2 ore	4 ore
1 : 1000	0. 10 %	+++	precipitato	precipitato
	0. 20 »	+++	»	»
	0. 40 »	+++	»	»
	0. 75 »	+++	»	»
1 : 5000	0. 10 »	+	+++	precipitato
	0. 20 »	+	+++	»
	0. 40 »	++	+++	»
	0. 75 »	++	+++	»
1 : 12000.	0. 10 »	±	±	±
	0. 20 »	+	++	++
	0. 40 »	++	+++	+++
	0. 75 »	++	+++	+++
1 : 14000.	0. 10 »	—	—	±
	0. 20 »	—	—	++
	0. 40 »	—	++	++
	0. 75 »	—	++	++
1 : 16000.	0. 10 »	—	—	±
	0. 20 »	—	—	+
	0. 40 »	—	—	++
	0. 75 »	—	+	++

Dalla prima delle due tabelle risulta intanto che un siero specifico per il *b. paratyphi B* provoca perfettamente l'agglutinazione anche in soluzioni di Na Cl al 0.20 %; dalla seconda poi si può rilevare come una soluzione al 0.10 % è troppo debole, in quanto che l'agglutinazione in essa è incerta dove con la stessa quantità di siero si ha un'agglutinazione evidente in soluzioni saline più forti; ma che adoperando una soluzione al 0.20 % si può osservare agglutinazione netta dopo 4 ore in un rapporto che si deve considerare come il limite del titolo agglutinante del siero.

Dalle osservazioni fatte sin qui risulta dunque il corollario pratico che *quando si deve fare una prova siero-agglutinante con germi che dànno il fenomeno dell'agglutinazione spontanea, si deve, per ovviare all'inconveniente di avere agglutinazione anche nei tubi di controllo, emulsionare i germi in soluzioni di Na Cl meno concentrate di quelle di solito usate al 0.75-0.85 %; per il nostro* b. paratyphi B, *per esempio, ci si servirà sempre di una soluzione di Na Cl al 0.20 %.*

***

Il fenomeno dell'agglutinazione spontanea meritava però di essere studiato un po' più intimamente, tanto più che, saggiando vari altri germi, mi sono potuto convincere che esso non è una proprietà speciale del *b. paratyphi B*, sul quale per primo lo ho osservato, ma comune ad alcuni altri microrganismi.

Prima però di studiare il comportamento verso le soluzioni saline di questi germi, dirò brevemente delle altre ricerche fatte per il *b. paratyphi B.*

Ho voluto anzitutto assicurarmi *se il fenomeno di agglutinazione osservato era provocato soltanto dalla presenza del cloruro sodico,* oppure se altri sali non avessero la medesima proprietà.

Ho preparato perciò delle soluzioni di KCl, $(NH_4)Cl$, $(NH_4)^2SO^4$ Na^2SO^4, K^2SO^4, $H(NH^4)^2PO^4$, HNa^2PO^4, HK^2PO^4, di vario titolo, dal 0. 10 % all'1 %: in ogni tubo emulsionavo in un cmc. delle varie soluzioni due anse normali di agarcoltura di *b. paratyphi B.* Esaminavo i tubi dopo 15′, 30′, 1 ora, 2 ore, 6 ore, 24 ore.

Dall'analisi comparativa dei risultati ottenuti si deduce che:

Il cloruro di sodio determina la agglutinazione nelle soluzioni a titolo più debole e nel minor tempo: seguono, in ordine decrescente, il cloruro di ammonio (A + dopo 1^h nella soluzione al 0, 50 %), il solfato di ammonio e quello di potassio (A + dopo 1^h nelle soluzioni al 0, 75 %), il solfato di sodio (A + dopo 24^h nelle soluzioni al 0, 75 %),

e il fosfato bibasico di ammonio (A + dopo 24h nella soluzione all'1 %); non vi è stata agglutinazione nel cloruro di potassio, e nei fosfati bibasici di sodio e di potassio.

Non vi ha quindi un comportamento simile fra i sali degli stessi metalli, nè fra quelli degli stessi acidi.

Per avere poi un risultato più esatto ho preparato delle soluzioni di KCl equimolecolari a quelle al 0, 20; 0, 40; 0, 60; 0, 75; 1, 0; 1, 5; 2, 0 % di Na Cl.

Facendo le emulsioni di due anse normali del *b. paratyphi B* in tali soluzioni, ho avuto questi risultati:

TABELLA V.

Soluzione di KCl al	1 ora	2 ore	6 ore	24 ore
0. 256 %	—	—	—	—
0. 516 »	—	—	—	—
0. 774 »	—	—	—	—
0. 967 »	—	—	—	±
1. 290 »	++	+++	precipitato	precipitato
1. 935 »	+++	precipitato	»	»
2. 580 »	+++	»	»	»

Se si paragonano ora i dati di questa tabella con quelli della tabella II, si deve concludere che *la agglutinazione non è una funzione della concentrazione molecolare*, ma dipende in gran parte dalla natura del sale; nelle soluzioni di KCl si incomincia ad avere agglutinazione in quei tubi, il cui titolo corrisponde all'1 % delle soluzioni di Na Cl: qui basta invece il 0. 40 % di cloruro sodico per provocare l'agglutinazione spontanea.

Era interessante ricercare se nella agglutinazione spontanea si verificassero alcuni di quei fatti che sono stati dimostrati nelle agglutinazioni specifiche.

Si sa per gli studi di Eisenberg e Volk (1) e di altri autori che i germi agglutinati da un siero specifico, centrifugati e raccolti, non si

(1) *Untersuchungen über die Agglutination.* Zeitschrift für Hygiene. Bd. XL, 1902.

agglutinano più se sono messi un'altra volta a contatto col siero agglutinante; e che d'altra parte un siero specifico dopo aver provocato la agglutinazione in una emulsione batterica ha perduto il suo contenuto in agglutinina.

Ora nella agglutinazione spontanea mi sono potuto convincere che ciò non avviene in alcuna maniera.

Fatta una emulsione del *b. paratyphi B* nella soluzione al 0.40 % di Na Cl (la più bassa capace di provocare netta la agglutinazione spontanea) aspettavo che i germi fossero agglutinati e precipitati. Raccoglievo quindi il liquido limpido e postolo in un altro tubo vi emulsionavo un'altra ansa di germi. Questi venivano agglutinati altrettanto completamente e prontamente dei primi; e questa prova si può ripetere due o tre volte successivamente, sempre collo stesso risultato.

Essa ci porta inoltre ad un' altra considerazione. *Nella agglutinazione spontanea, la soluzione salina non cede ai batteri il suo contenuto in Na Cl, non avviene cioè una combinazione chimica fra i batteri agglutinati e il sale disciolto nel liquido:* la soluzione mantiene il suo titolo come lo dimostra da una parte il potere di essa nel provocare ancora la agglutinazione spontanea con eguale intensità, e dall'altra la analisi mediante la aggiunta di $Ag\ NO^3$ comparativa con una soluzione nuova al 0.40 % di Na Cl.

Se si fa un' emulsione di *b. paratyphi B* in soluzione di cloruro sodico al 0.75 %, e dopo avvenuta la agglutinazione si allontana il liquido limpido e si emulsionano nuovamente i batteri in soluzione fresca di cloruro sodico a 0.75 %, compare un'altra volta la agglutinazione. *Quindi i batteri agglutinatisi non hanno perduto la proprietà di dare di nuovo il fenomeno della agglutinazione quando siano riportati in condizioni adatte.*

Inoltre è importante il fatto che l' *effetto prodotto sui batteri dalle agglutinine specifiche, non ha alcuna influenza sulla agglutinazione spontanea e viceversa.* Ciò risulta dalle seguenti esperienze:

In tre tubi, 1^a, 2^a, 3^a, si pone un cmc. di emulsione di *b. paratyphi B* in soluzione di Na Cl al 0.20 % e vi si aggiunge, in dosi crescenti, il siero di un animale immunizzato col *b. paratyphi B.*

In altri tre tubi 1^b, 2^b, 3^b, si prepara un cmc. di emulsione di *b. paratyphi B* in soluzione di Na Cl al 0.75 %. Dopo due ore nei sei tubi, è avvenuta la agglutinazione ed i batteri sono precipitati. Si allontana in tutti i tubi il liquido limpido e si emulsiona il sedimento dei tubi 1^a, 2^a, 3^a, in soluzione Na Cl al 0.75 %; il sedimento dei tubi 1^b, 2^b, 3^b, in soluzione al 0.20 % alla quale è stato aggiunto il siero specifico nelle stesse proporzioni che si erano usate per i tubi 1^a, 2^a, 3^a. Dopo breve tempo nei sei tubi, si ha agglutinazione nettissima.

Queste differenze fra agglutinazione spontanea e agglutinazione specifica appaiono tanto più spiccate in quanto il De Blasi (1), in un recente lavoro, ha dimostrato che nel siero degli animali normali vi sono delle sostanze capaci di ostacolare la azione del siero specifico, proveniente da animali di specie diversa, sui rispettivi germi: invece *nel sangue di cavia e di coniglio normali ho potuto dimostrare non esistere alcuna sostanza che impedisca la agglutinazione del b. paratyphi B nelle soluzioni di cloruro sodico.*

Ho già detto come l'idrato sodico sia capace d'impedire il fenomeno della agglutinazione spontanea. Lo stesso avviene per le soluzioni di idrato potassico. Però questi alcàli agiscono soltanto in quanto stabiliscono nel liquido una reazione alcalina, neutralizzata la quale si può facilmente provocare la agglutinazione.

Si preparano dei tubi con un cmc. di emulsione di *b. paratyphi B* in soluzione all'1 0/00 di idrato potassico e si lasciano i germi a contatto col liquido per alcune ore. Si neutralizza quindi l'omulsione con acido ossalico, perfettamente, in modo che non vi sia eccesso di acido; si centrifuga e si allontana il liquido. Se ora al sedimento, nei vari tubi, si aggiungono delle soluzioni di Na Cl di vario titolo, si vedrà avvenire, dopo breve tempo, la agglutinazione in tutti quei tubi nei quali il titolo del sale supera il 0. 30 %.

I batteri quindi essendo stati a contatto con la soluzione di KOH non hanno perduto la proprietà di agglutinarsi se riportati nelle condizioni favorevoli (2).

***

Come ho detto *altri germi hanno presentato il fenomeno della agglutinazione spontanea*, e sono:

uno degli stipiti di *b. typhi* conservati nell'Istituto, e precisamente uno stipite avuto da Kràl;

---

(1) *Intorno alla presenza di sostanze antiagglutinanti nei sieri normali.* Questi Annali, vol. XV, 1905.

(2) A questo proposito desidero far notare che ho osservato come la presenza di KOH all'1 0/00 inibisce anche il fenomeno dell'agglutinazione specifica. Per esempio, se si fa un'emulsione di *b. typhi* in soluzione di KOH all'1 0/00 e vi si aggiunge anche in forti proporzioni del siero antitifico, non si osserva alcuna agglutinazione neppure dopo 24 ore. Neutralizzando ora l'emulsione con acido ossalico compaiono ben presto nell'emulsione dei fiocchetti che precipitano al fondo, lasciando limpido il liquido soprastante. Questo mezzo di impedire la agglutinazione, con una sostanza che non altera molto la vitalità dei germi, credo potrà essere di grande utilità, per esempio, per le ricerche *in vitro* sul potere batteriolitico dei sieri.

un *b. dysentericum Kruse*, pur esso proveniente dall' Istituto di Kràl;

un *b. coli commune* che si conserva da anni nell'Istituto;

un batterio che ha moltissimi caratteri del *b. coli* ma non è stato mai virulento, isolato dall'acqua Marcia (*b. colisimile*).

Facendo le emulsioni di questi 4 germi in soluzioni di cloruro sodico di vario titolo, *essi mostrano una agglutinabilità sempre in rapporto colla quantità di Na Cl contenuta nel liquido, ma diversa per i diversi germi.*

Quello che si agglutina in liquidi che contengono le più piccole traccie di cloruro di sodio è il *b. colisimile* (anche in H^2O distillata se non si ha l'avvertenza di non trasportare dalle agarcolture, insieme con i batteri, anche un po' dell'acqua di condensazione); il germe invece che per agglutinarsi richiede la massima quantità di cloruro sodico è il *b. typhi* (soluzioni di Na Cl al 2-3%); il *b. dysentericum Kruse* si comporta circa come il *b. paratyphi B*, il *b. coli* sta fra questo e il *b. typhi* (soluzioni di Na Cl al 0.75 %).

La percentuale dei sali necessaria per provocare il fenomeno della agglutinazione è, anche per questi germi, varia a seconda della natura del sale.

Ecco, per esempio, riassunto il comportamento nelle soluzioni di cloruro di potassio:

TABELLA VI.

	Dopo 1 ora					Dopo 6 ore				
	b. colisimile	*b. paratyphi B*	*b. dysentericum Kruse*	*b. coli commune*	*b. typhi*	*b. colisimile*	*b. paratyphi B.*	*b. dysentericum Kruse*	*b. coli commune*	*b. typhi*
Acqua distillata	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Soluzione KCl al 0.256 % . .	+++	—	—	—	—	precipitato	—	—	—	—
Id. 0.516 » . .	+++	—	—	—	—	»	—	—	—	—
Id. 0.774 » . .	+	—	—	—	—	+ +	—	—	—	—
Id. 0.967 » . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Id. 1.290 » . .	—	++	±	—	—	—	+ + +	+++	—	—
Id. 1.935 » . .	—	+++	±	±	±	—	precipitato	precipitato	+ +	+
Id. 2.580 » . .	—	+++	+	±	±	—	»	»	+ + +	++

Questa tabella dimostra un altro fatto importante: che cioè *esiste una concentrazione salina che rappresenta l'optimum per la agglutinazione spontanea dei germi*: al di sotto come al di sopra di questo punto l'agglutinazione è più scarsa o manca: ciò appare specialmente dimostrativo per il *b. colisimile* per il quale questo *optimum* è dato dalle soluzioni comprese circa fra il 0.20 % e il 0.80 % di KCl. Lo stesso si dimostra per il *b. typhi* nelle soluzioni di cloruro sodico; qui l'*optimum* è dato dalle soluzioni al 2-3 %.

Il vario comportamento poi dei diversi germi nelle stesse e nelle varie soluzioni saline ci dimostra che, se la massima importanza per la produzione del fenomeno della agglutinazione spontanea è da attribuirsi al liquido nel quale sono emulsionati i batteri, vi è però anche qualche cosa, che per ora ci sfugge, nella costituzione dei batteri stessi, qualche cosa propria alle singole specie e che determina la maggiore o minore facilità con la quale reagiscono alla stessa azione delle soluzioni saline.

***

Da tutte queste ricerche quale concetto ci possiamo fare del fenomeno della agglutinazione spontanea?

Esso è determinato dalla azione sopra varie specie batteriche di alcune sostanze saline, disciolte nel liquido che tiene emulsionati i germi: occorre che queste sostanze si trovino in una certa quantità, non troppo scarsa e non eccessivamente elevata, quantità che in genere è varia col variare della sostanza salina e col variare del microrganismo.

Non è un fenomeno biologico, poichè si compie ugualmente con emulsioni di batteri vivi e con emulsioni di batteri previamente uccisi.

Non si tratta certamente neppure di un processo chimico di combinazione: bastano ad escluderlo la dimostrazione della riagglutinabilità dei germi e del potere di riagglutinazione che rimane al liquido.

E' dunque un fenomeno puramente fisico; ma di quale natura?

Si potrebbe pensare che nella produzione del fenomeno avesse importanza lo stato di jonizzazione dei sali adoperati. In tal caso dovrebbe esserci un certo parallelismo fra la entità del fenomeno e la dissociazione dei sali nelle soluzioni che lo provocano. La dissociazione potrebbe influire o per la presenza dell'anione, o per quella del catione, ovvero, indipendentemente dall'uno e dall'altro, già di per sè stessa, per un meccanismo che, trattandosi di corpi batterici di com-

posizione chimica tanto complessa, può non essere di natura puramente fisica nel senso ordinario della parola.

Ora per escludere la prima supposizione basta rammentare le esperienze fatte con soluzioni equimolecolari di Na Cl e di K Cl; in questo caso essendo presso a poco uguale la concentrazione dell'anione l'effetto avrebbe dovuto avere la stessa intensità, mentre invece abbiamo visto che i risultati sono ben differenti fra loro. D'altra parte, rammentando le esperienze comparative fatte con soluzioni di Na Cl e di Na^2SO^4, appare che neppure la concentrazione del catione ha una importanza diretta nella produzione del fenomeno.

In generale, non essendovi corrispondenza fra l'intensità del fenomeno e il grado di dissociazione, concludiamo che *lo stato di jonizzazione del sale non esercita alcuna azione diretta sulla agglutinazione spontanea.*

Non essendo quindi sostenibile la suddetta ipotesi, mi sembra più probabile che *si tratti di fenomeni di alterata attrazione fra i corpi batterici* per l'intervento di altri fattori fisico-chimici, principalmente della pressione osmotica e della viscosità.

A questa ipotesi non contraddice nessuno dei risultati delle mie esperienze. E' ovvio che ciascuna cellula batterica si comporti, dal punto di vista della pressione osmotica e della viscosità, in modo differente verso soluzioni di diverso titolo dello stesso sale o di ugual titolo di sali diversi; e d'altra parte le varie specie batteriche possono comportarsi in modo molto differente verso soluzioni di ugual titolo dello stesso sale.

Questo modo di vedere, che scaturisce dai risultati sperimentali da me ottenuti, si accorda pienamente con la ipotesi che il Bordet già fece per la spiegazione della seconda fase nel fenomeno della agglutinazione specifica.

CONCLUSIONI.

1. Il fenomeno della agglutinazione spontanea si manifesta abbastanza frequentemente in parecchie specie batteriche.

2. Esso dipende dal titolo e dalla qualità delle soluzioni e in genere l'uno e l'altra sono diversi per i diversi batteri.

3. L'agglutinazione spontanea è un fenomeno essenzialmente diverso dalla agglutinazione specifica.

4. Il fenomeno della agglutinazione spontanea è di ordine puramente fisico, e trova una esauriente spiegazione nella teoria di Bordet.

LABORATORIO DI MICROGRAFIA E BATTERIOLOGIA DELLA SANITÀ PUBBLICA

OSSERVAZIONI
relative alla fluidificazione della gelatina per opera dei microrganismi

per il Dottor **CARLO TIRABOSCHI.**

Poco più di un anno fa è apparsa nel *Zeitschrift für Hygiene* una breve nota del dott. Mavrojannis (libero docente di patologia generale in Atene), dal titolo: *Il formolo come mezzo di ricerca della fluidificazione della gelatina per opera dei microbi* (VI). Siccome le conclusioni alle quali il Mavrojannis è giunto in base alle sue osservazioni, hanno dato origine alle ricerche che esporrò nella presente memoria, comincio col riassumere il lavoro del Mavrojannis.

Questi osservò che, esponendo ai vapori di formalina la gelatina fluidificata da germi liquefacenti, la gelatina in alcuni casi si rapprendeva in una massa solida, nuovamente fluidificabile col calore, in altri casi invece restava permanentemente fluida, anche dopo una esposizione di parecchi mesi; ne conchiuse che l'azione sulla gelatina dei fermenti prodotti dai diversi liquefacienti è diversa, che cioè la gelatina è da essi trasformata in prodotti di natura diversa. Per studiare di che natura fossero questi prodotti, istituì delle esperienze con la papaina e la pancreatina e trovò che facendo digerire della gelatina da questi due enzimi, si formano successivamente vari prodotti, che si possono raggruppare in due serie ben distinte: quelli della 1ª serie vanno fino alla gelatosi e sono solidificati dal formolo, quelli della 2ª comprendono le ulteriori trasformazioni della gelatosi fino al grado di peptoni in senso stretto e forse più oltre e non sono solidificati dalla formaldeide. Dunque, dei germi liquefacienti la gelatina alcuni produrrebbero delle diastasi che sarebbero capaci di trasformare la gelatina stessa soltanto fino al grado di gelatosi, altri delle diastasi capaci di spingere la trasformazione fino al grado di peptoni e forse più in là; apparterrebbero alla 1ª categoria: *Staphylococcus pyogenes aureus* e *albus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pyocyaneus* e *Vibrio cholerae*; alla 2ª: *Vibrio Deneke*, *Vibrio Finkler-Prior* e *Vibrio Metchnikov.* La solidificazione, per opera della formaldeide, della gelatina fluidificata avverrebbe dopo 3-4 giorni nel caso dei due stafilococchi suddetti e del vibrione di Koch, dopo 6-8 giorni nel caso del bacillo del carbonchio e dopo 12-15 giorni nel caso del piocianeo. In

genere la solidificazione si compirebbe tanto più rapidamente quanto più rapidamente si è compiuta la fluidificazione; se questa ha impiegato molti giorni, la gelatina si solidificherebbe solo molto tardi. La gelatina fusa in 1-2 giorni soltanto si rapprende in 1-2 giorni e in tali condizioni torna solida anche quella fluidificata dai germi della 2ª categoria. Però, mentre con colture di questi germi di soli 6-7 giorni, in cui metà soltanto della gelatina si è liquefatta, questa non torna solida neppure con l'esposizione di parecchi mesi alla formalina, con colture di stafilococchi e di carbonchio di 75 giorni, in cui tutta la gelatina si è liquefatta, questa torna solida dopo 8-15 giorni di azione del formolo. In tutti i casi la gelatina fluidificata da uno dei liquefacienti della 1ª categoria e poi risolidificata dalla formalina, riscaldata tornerebbe a fondere e in ciò si distinguerebbe dalla gelatina che è stata sottoposta per un'ora al vapor d'acqua bollente nella pentola di Koch e che dopo tale trattamento non possiede più la capacità di risolidificarsi a temperature inferiori ai 20° C.; tale gelatina è solidificata dalla formaldeide, ma poi riscaldata non torna liquida.

Avendo avuto occasione di studiare dal punto di vista dei caratteri morfologici e culturali, varie specie di ifomiceti, ho voluto vedere se per esse si ripetesse il fenomeno già osservato dal Mavrojannis per le diverse specie di schizomiceti e potei constatare (VIII e IX) che mentre per quasi tutte le muffe da me studiate la gelatina fluidificata non è risolidificata dalla formaldeide neppure dopo una esposizione di molti giorni, quella fluidificata dall'*Aspergillus fumigatus* è risolidificata dopo 1-2 giorni soltanto; però, riscaldata, essa non torna fluida, ma solo si rammollisce un po'. Essendo questo fatto in opposizione a quello riscontrato dal Mavrojannis per i germi della 1ª categoria, ho voluto vedere se tale differenza si ripetesse per altre specie di ifomiceti e schizomiceti e ho ripreso le esperienze del Mavrojannis, estendendole a molti altri germi, per vedere anche se fosse esatta la conclusione alla quale egli era giunto, che cioè la maggior parte degli schizomiceti da lui sperimentati producessero delle diastasi assolutamente incapaci di trasformare la gelatina fino al grado di peptone.

E tra gli schizomiceti ho preso in speciale considerazione il vibrione del colera e altri numerosi vibrioni, per vedere se la proprietà di trasformare la gelatina fino al grado di peptone mancasse sempre al vibrione di Koch, qualunque fosse la sua provenienza, e spettasse invece a tutti i vibrioni più o meno colerasimili, giacchè secondo il Mavrojannis tale proprietà era comune alle tre specie di vibrioni da lui presi in esame, e cioè ai vibrioni di Deneke, di Finkler e Prior e di Metchnikov. Non avendo a mia disposizione dei campioni di queste tre specie, ne ho esaminate altre cinque, di cui tre isolate dal dott. Massone dalle acque del porto di Genova

e due isolate da me dall'acqua potabile di Genova. Quanto al vibrione colerigeno, ho preso in esame cinque campioni di provenienza diversa: il 1°, quello conservato nel laboratorio di batteriologia della Sanità pubblica in Roma; il 2° nell'Istituto di igiene di Genova, proveniente da Amburgo; altri due (3° e 4°) isolati da due diversi casi di colera nella piccola epidemia di Genova del 1893, e l'ultimo (5°) isolato da un altro caso di colera ad Acqui nel 1894.

Prima di esporre i risultati da me ottenuti, riassumerò brevissimamente alcuni dei più importanti lavori riguardanti la fluidificazione della gelatina per opera dei microrganismi.

Che alcuni batteri siano capaci di fondere la gelatina, era stato osservato già da molto tempo.

Hauser (IV) nel 1893 impiegando i vapori di formaldeide per la conservazione delle colture, vide che la gelatina fluidificata dai batteri, sottoposta all'azione di questi vapori, torna di nuovo solida e che tale gelatina formaldeidizzata (*Formalin-gelatine*) anche se riscaldata non ritorna più liquida.

Si riteneva comunemente che nella fluidificazione della gelatina per opera dei germi liquefacienti avvenisse una vera e propria peptonizzazione della gelatina stessa, ma Fermi e Pampersi (III) dimostrarono che tutti i microrganismi (schizomiceti, blastomiceti, ifomiceti), anche quelli che producono un fermento proteolitico, non peptonizzano mai l'albumina, nè gli albuminoidi (fibrina, caseina, siero di sangue, gelatina), ma soltanto li disciolgono; gli enzimi che essi producono sarebbero dunque proteolitici ma non peptonizzanti. La ricerca del peptone nelle colture era fatta da questi due autori mediante la reazione del biurete, con la quale anzi essi sarebbero riusciti a dimostrare che dopo qualche tempo scompaiono nelle colture anche il peptone ed altre sostanze che danno la reazione del biurete e che si trovavano precedentemente nel substrato culturale.

Con metodi più rigorosi e con ricerche chimiche più accurate, il Cacace (II) riscontrava invece la presenza, oltre che di protogelatosi e deuterogelatosi, anche di piccole quantità di peptone di gelatina nelle colture di *Sarcina aurantiaca*, *Bacillus anthracis* e *Staphylococcus pyogenes aureus* in un infuso acquoso al 10 per cento di gelatina, precedentemente controllata e riconosciuta come assolutamente priva di peptone e contenente solo delle piccolissime tracce di gelatosi (1). Per eseguire la ricerca delle gelatosi e del peptone, il Cacace attendeva l'inizio della fluidificazione e in alcuni casi lasciava che questa si prolungasse un po', mai però fino a fluidificazione completa; a sviluppo molto avanzato infatti, le gelatosi e anche il peptone possono mancare del tutto, trasformate in altre sostanze ancor meno complesse, come accade per il peptone sottoposto artificialmente a una lunga azione del succo pancreatico.

---

(1) Questa prova di controllo nel substrato culturale sterile è necessaria per evitare di incorrere nell'errore di attribuire all'azione dei germi la presenza di quantità minime di peptoni, già precedentemente esistenti nel terreno di coltura. Tale prova è stata trascurata da alcuni autori, ad esempio dal Miller (VII), le cui conclusioni sono quindi destituite di valore.

Ho voluto riportare le conclusioni alle quali sono giunti Fermi e Pampersi prima, Cacace poi, perchè esse sono in contraddizione con le osservazioni del Mavrojannis; farò anzi osservare che due dei tre schizomiceti presi in esame dal Cacace, cioè il *Bacillus anthracis* e lo *Staphylococcus pyogenes aureus*, sono appunto di quelli che il Mavrojannis colloca nella 1ª categoria, capaci cioè di trasformare la gelatina in peptone.

Senza entrare per ora nella quistione se questi germi diano realmente luogo o no a formazione di peptone dalla gelatina, vediamo se sia vero ciò che sostiene il Mavrojannis, che cioè esistono alcuni schizomiceti liquefacienti la gelatina, ma incapaci di trasformarla in un prodotto che non sia più risolidificato dalla formaldeide. Secondo il Mavrojannis apparterrebbero a questa categoria: *Bacillus anthracis*, *Bacillus pyocyaneus*, *Staphylococcus pyogenes aureus* e *albus*, *Vibrio cholerae*. Ho voluto quindi innanzi tutto esperimentare con questi germi. Quanto al *Bacillus anthracis*, ho eseguito le mie ricerche su due campioni di diversa provenienza, uno conrservato in questo laboratorio, e l'altro nell' Istituto d' igiene di Genova: del *pyocyaneus* ho avuto un solo campione; quanto agli stafilococchi. invece dell'aureo e dell'albo ho adoperato il citreo; infine per il vibrione di Koch ho esperimentato con tutti e cinque i campioni di cui ho riferito sopra.

Trattandosi di germi patogeni il cui *optimum* di temperatura è circa a 37° C., ho istituito due serie di colture, le une per infissione alla temperatura di 20°-24° C., alla quale la gelatina non ancora trasformata dall' azione dell' enzima prodotto dal germe coltivato restava ancora solida, cosicchè si poteva direttamente stabilire la data d' inizio della fluidificazione, seguirne tutto il processo e vedere quando essa era completa; le altre alla temperatura di 37° C. e nelle quali quindi la constatazione della avvenuta fluidificazione aveva luogo con l' esposizione, ripetuta ogni giorno, delle provette di coltura in acqua fredda, alla temperatura di 8-10° C., prendendo come data di avvenuta completa fluidificazione quella in cui la gelatina dopo un soggiorno di mezz' ora circa nell'acqua fredda corrente si conservava perfettamente e completamente fluida. Ho voluto fare anche questa serie di colture, per vedere se quei germi che alla temperatura di 20° C. non avessero prodotto un fermento capace di trasformare la gelatina in un prodotto non risolidificabile dalla formaldeide, acquistassero tale proprietà coltivati nelle condizioni di temperatura le più favorevoli al loro sviluppo. Questo metodo di studiare la fluidificazione della gelatina con delle colture mantenute alla temperatura di 37° C. è stato introdotto nella tecnica

batteriologica da Bitter (I) e serve per dimostrare il potere di fluidificazione in quei germi che non si sviluppano alla temperatura di 20°-24° C., come per esempio il bacillo della morva. Per essere sicuro poi che la permanenza della gelatina allo stato fluido alla temperatura di 8°-10° C. dipendesse realmente dalla trasformazione operata dagli enzimi prodotti dai batteri in esame e non da una eventuale alterazione della gelatina stessa per opera della prolungata esposizione alla temperatura di 37° C., tutte le volte che ricorrevo alle colture a 37° C. di germi fluidificanti la gelatina, mantenevo alla stessa temperatura per lo stesso tempo una coltura di tifo in gelatina e un tubo di gelatina sterile, che mi servivano quindi di controllo.

Quanto alla gelatina adoperata, farò osservare anzitutto che essa era sempre la stessa per tutte le culture di una data serie e ciò per potere stabilire dei confronti; generalmente ho adoperato la comune gelatina nutritiva al 12 per cento, leggermente alcalina; altre volte ho adoperato della gelatina al 15 per cento, preparata in modo da avere il suo punto di fusione a circa 27° C. (sterilizzazione abbreviata, secondo Forster), il che era necessario per alcune specie, come per esempio per l'*Aspergillus fumigatus,* che non si sviluppano o si sviluppano male a 20°-21° C.; qualche volta ho usato della gelatina leggerissimamente alcalina, quasi neutra, altre volte della gelatina spiccatamente alcalina; in alcuni casi infine, ad esempio per dei vibrioni acquatili ed altri schizomiceti saprofiti e per alcuni ifomiceti, ho adoperato anche della gelatina preparata secondo il metodo di Abba e da lui consigliata per l'analisi batteriologica dell'acqua potabile.

Ecco ora come ho proceduto nelle esperienze. Dopo un numero variabile di giorni, a partire da quello in cui avevo constatata la perfetta e totale fluidificazione della gelatina, versavo la gelatina liquefatta in una capsulina di vetro sterilizzata (1); se la gelatina contenuta nella provetta era limpida, con un deposito al fondo, la decantavo senz'altro, con cura, nella capsulina; se invece era torbida, qualche volta la filtravo traverso ad un piccolo filtro sterilizzato, precauzione del resto inutile. Poi collocavo le capsule in un recipiente di vetro qualunque, aggiungendo una capsula più larga piena di formalina e tutti i giorni osservavo se in qualche capsula la

---

(1) Nelle singole capsuline versavo ordinariamente tanta gelatina da ricoprirne il fondo con uno strato di mezzo centimetro circa di spessore. Probabilmente lo spessore dello strato di gelatina deve avere una influenza sulla maggiore o minore rapidità di solidificazione della gelatina stessa, per opera del formolo. Il Mavrojannis mi pare che trascuri questo dato.

gelatina si fosse solidificata e in caso positivo vedevo, se riscaldandola, essa tornasse fluida. Il recipiente contenente le capsuline era ben chiuso e veniva conservato al riparo della luce, ad una temperatura di 15° C. circa; per essere poi sicuro che l'ambiente fosse sempre saturo di vapori di formaldeide, rinnovavo ogni tanto la formalina.

Nel seguente quadro sono raccolti i dati relativi alle specie batteriche sopra nominate.

Numero d'ordine	GERMI	Temperatura di coltura	Dopo quanti giorni la fluidificazione era completa	Dopo quanti altri giorni la gelatina si è esposta ai vapori di formalina	Dopo quanti giorni la gelatina si è solidificata	Se la gelatina tornava a fondere col riscaldamento
1	*Bacillus anthracis* I	37° C.	3	5	—	. .
2	Id. II	id.	2	5	24	sì
3	Id. II	id.	3	10	7	sì
4	Id. II	id.	3	1	3	no
5	Id. II	id.	3	1	1	sì
6	Id. II	id.	3	15	5	sì
7	Id. II	20° C.	15	15	—	. .
8	Id. II	24° C.	8	1	3	no
9	*Bacillus pyocyaneus*	37° C.	2	1	4	no
10	Id.	id.	2 ½	15	—	. .
11	Id.	24° C.	10	15	20	sì
12	*Staphyl. pyogenes citreus* .	37° C.	7	1	2	sì
13	Id. .	id.	8	1	2	no
14	Id. .	id.	7	7	—	. .
15	Id. .	21° C.	23	5	13	sì
16	Id. .	20° C.	29	15	—	. .
17	Id. .	25° C.	10	1	2	sì
18	*Vibrio cholerae* I	37° C.	3	7	—	. .
19	Id. II	id.	3	7	—	. .
20	Id. III.	id.	4	6	8	Diventa meno consistente ma non fluida.
21	Id. IV.	id.	4	6	—	. .
22	Id. V	id.	4	6	10	sì
23	Id. II	26° C.	5	1	1	no
24	Id. II	24° C.	12	1	1	no
25	Id. I	20° C.	16	15	—	. .
26	Id. II	id.	15	15	—	. .
27	Id. III.	id.	18	15	—	. .
28	Id. IV.	id.	18	15	—	. .
29	Id. V	id.	18	15	—	. .

Risulta evidente da questo quadro come anche quei germi che il Mavrojannis colloca nella 1ª categoria, incapaci cioè di trasformare la gelatina in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide, in realtà siano anche essi capaci di compiere questa trasformazione, e ciò non soltanto se coltivati alla temperatura di 37° C., che è la più favorevole al loro sviluppo, ma anche se coltivati alla temperatura di 20°-24° C.; nell'un caso e nell'altro, però, è necessario dare al germe il tempo di produrre una sufficiente quantità di enzima proteolitico, ed a questo di esplicare la sua azione per intiero; il tempo necessario per compiere questa trasformazione è, per le specie batteriche sopra nominate, in generale, minore nelle colture a 37° C. che in quelle a 20°-24° C.

Se però la gelatina, anche di colture a 37° C., si espone ai vapori di formalina, lo stesso giorno che se ne è constatata la perfetta e completa fluidificazione, o soltanto 1-2 giorni dopo, essa viene risolidificata e anzi, in generale, per uno stesso germe, tanto più rapidamente quanto più presto fu sottoposta all'azione della formaldeide. Così mentre, secondo il Mavrojannis, occorrono 3-4 giorni perchè sia risolidificata la gelatina liquefatta dagli stafilococchi piogeni e dal vibrione del colera, 6-8 per il bacillo del carbonchio e 12-15 per il piocianeo, dal mio quadro risulta che possono bastare rispettivamente 2, 1, 1, 3 giorni. Se invece la gelatina è sottoposta all'azione dei vapori di formalina molti giorni dopo che se ne è constatata la totale fluidificazione, essa o non torna mai solida oppura è risolidificata dopo molti giorni (vedi p. es. n. 2 della tabella).

Anche la gelatina di colture mantenute a una temperatura inferiore al punto di fusione della gelatina stessa, se viene sottoposta all'azione del formolo il giorno stesso che se ne è completata la fluidificazione o pochi giorni dopo, torna a solidificarsi, anche qui, in generale, per uno stesso germe, tanto più lentamente quanto più tardi essa venne esposta ai vapori di formalina (vedi, p. es., n. 11 della tabella). Il Mavrojannis dice, a questo proposito, che con colture di carbonchio e di stafilococco piogene aureo e albo, di 75 giorni di età, in cui tutta la gelatina si è fluidificata, la solidificazione della gelatina avviene dopo 8-15 giorni di azione della formaldeide. Io veramente ho trovato che la fluidificazione totale della gelatina si compie molto più rapidamente, e cioè nelle comuni provette, contenenti da 6 ad 8 cmc. di gelatina, la fluidificazione è completa dopo 15 giorni circa (vedi n. 7 della tabella) nelle colture di carbonchio a 20° C. e dopo 8-10 giorni (vedi n. 8) in quelle a

24° C., dopo 25 giorni circa (vedi n. 15 e 16) nelle colture di stafilococco piogene citreo a 20°-21° C. e dopo 10 circa in quelle a 25° C. (vedi n. 17). Se dopo che si è compiuta la totale fluidificazione della gelatina si attende ancora qualche giorno (15, per esempio; vedi n. 7 e n. 16) per esporla ai vapori di formalina, questi non sono più capaci di solidificarla neppure dopo tre o quattro mesi.

Lo stesso fatto si ripete per le colture a 37° C., almeno per quanto si riferisce allo stafilococco citreo, oltre che al piocianeo e al vibrione del colera (vedi n. 10, 14, 18, 19, 21); invece per quel che riguarda il carbonchio, mentre nelle colture a 37° C. la solidificazione della gelatina fluidificata dal campione n. I non aveva più luogo se la gelatina, dopo constatata la sua perfetta fluidificazione, si lasciava a 37° C. per altri 5 giorni soltanto prima di esporla ai vapori di formalina, quella fluidificata dal campione n. II tornava solida anche se, prima di sottoporla all'azione della formaldeide, si lasciava a 37° C. per 5, 10 e perfino 15 giorni. Devo però notare che la gelatina adoperata per le colture di questo II campione era debolissimamente alcalina e che lo sviluppo del bacillo del carbonchio era in essa tutt'altro che rigoglioso; con la stessa qualità di gelatina però, nelle colture a 20° C. circa, la solidificazione della gelatina non aveva più luogo neppure per questo campione II (vedi n. 7 della tabella). Non avendo più a mia disposizione il campione I non ho potuto ripetere con esso le esperienze sulla gelatina debolissimamente alcalina; il fatto però che anche nelle colture a 37°, in gelatina debolmente alcalina, del campione II, la gelatina, fluidificata completamente e lasciata a 37° per altri 10 giorni, tornava a solidificarsi per opera della formaldeide, mi fa ritenere che in questo diverso comportamento, per rispetto al formolo, della gelatina fluidificata abbiano importanza non solo la reazione della gelatina, ma anche la temperatura, e che per il carbonchio la trasformazione della gelatina in un prodotto non risolidificabile dalla formaldeide si compia più facilmente e più presto nelle colture a 20°-22° C., che in quelle a 37° C. (1). E che la reazione

---

(1) Che però anche nelle colture a 37° C. la gelatina possa essere trasformata in un prodotto non più solidificabile dal formolo, l'ho potuto dimostrare con vari esperimenti, per esempio col seguente: ho innestato i bacilli del carbonchio in tre provette contenenti una quantità uguale della stessa gelatina, ne ho mantenute due a 37° e una a 21° C.; nelle prime due la gelatina era completamente liquefatta dopo due giorni, nella terza dopo 13 giorni; a partire da questo giorno in cui fu constatata la totale fluidificazione della gelatina nella terza provetta, lasciai passare altri 15 giorni, non solo per questa terza provetta a 21° C. ma anche per una delle due

della gelatina abbia in questo fenomeno una influenza importante. lo dimostrano i diversi risultati ottenuti ai numeri 2 e 3 della tabella; mentre la gelatina del n. 2, che era debolissimamente alcalina, fu solidificata dopo 24 giorni d'azione della formaldeide, quella del n. 3 che era leggermente alcalina e che fu esposta molto più tardi ai vapori di formalina fu solidificata dopo 7 giorni soltanto. per quanto lo spessore dello strato di gelatina non fosse nel n. 3 più basso che nel n. 2.

Del resto aggiungerò che altri fattori devono influire su questo fenomeno e che la mancanza della conoscenza esatta di questi fattori fa talvolta apparire capriccioso l'andamento del fenomeno. Si hanno infatti delle differenze non solo per germi della stessa specie ma di provenienza diversa, ma anche con germi della stessa provenienza, coltivati sullo stesso substrato e nelle stesse condizioni di temperatura, ecc., che hanno impiegato lo stesso tempo per fluidificare la gelatina e la cui gelatina fluidificata è stata esposta ai vapori di formalina dopo lo stesso periodo di tempo e in uno strato presso a poco dello stesso spessore. Bisogna però osservare a questo proposito che il tempo da me è stato calcolato a giorni e che se fosse stato invece calcolato più esattamente ad ore, si sarebbe forse trovata la causa della differenza nella rapidità della solidificazione.

Ad ogni modo quello che mi preme di far rilevare qui è che non sempre alla temperatura che costituisce l'*optimum* per lo sviluppo di un dato germe corrisponde l'*optimum* per la produzione del fermento proteolitico, nel senso almeno che questo fermento sia capace di trasformare la gelatina in un prodotto non più solidifi-

---

tenute a 37° C., cosicchè per questa passarono 26 giorni dal giorno in cui era avvenuta la completa fluidificazione della gelatina; per l'altra provetta a 37° C. lasciai trascorrere tre giorni di meno. La gelatina di tutte e tre le provette non fu risolidificata dai vapori di formalina, neppure dopo una esposizione di due o tre mesi. La trasformazione della gelatina in un prodotto non risolidificabile dal formolo avviene dunque, per i bacilli del carbonchio, più presto nelle colture a 20°-22° C. che in quelle a 37° C., se il tempo si calcola a partire dal giorno in cui si è compiuta la fluidificazione completa della gelatina; avviene invece più presto nelle colture a 37° C. che in quelle a 20°-22° C., se il tempo si calcola dal giorno in cui si sono innestati i bacilli del carbonchio e ciò perchè questi bacilli fluidificano la gelatina molto più presto a 37° C., che a 20°-22° C. Per gli altri germi patogeni sopra nominati (stafilococco citreo, piocianeo e vibrione del colera), tale trasformazione si compie più rapidamente nelle colture a 37° C. che in quelle a 22° C., anche se il tempo si calcola dal giorno in cui si è compiuta la fluidificazione completa, benchè anche per questi germi si ripeta il fatto che fluidificano la gelatina molto prima a 37° che a 20°-22° C.

cabile dalla formaldeide. Anche per questa manifestazione della vita batterica si ripete dunque quello che già è noto per la produzione di pigmenti da parte dei batteri cromogeni, ad esempio dello stafilococco citreo ed aureo, del piocianeo, ecc., e questo parallelismo mi conferma sempre più nella convinzione che prima di affermare che un germe liquefaciente la gelatina è incapace di trasformare questa in una sostanza non più solidificabile dal formolo, bisogna aver coltivato il germe in questione nelle condizioni più favorevoli per compiere questa trasformazione. Invece, quindi, di assoluta incapacità da parte di un germe a produrre tale trasformazione, sarà meglio parlare di maggiore o minore facilità, a seconda delle diverse condizioni.

Quanto poi sulla rapidità della solidificazione possa influire la diversità di provenienza di un dato germe, risulta in modo evidentissimo dai dati esposti dal n. 18 al n. 22 della tabella; le colture fatte nella identica gelatina con i cinque diversi campioni di colera sono rimaste 10 giorni a 37° C.; in due (n. 18 e 19) la gelatina era perfettamente liquefatta dopo tre soli giorni di incubazione e lo sviluppo fu rigoglioso e abbondante e in queste la gelatina liquefatta non fu punto solidificata dalla formaldeide, neppure dopo un mese di esposizione; lo stesso accadde per una (n. 21) delle altre tre, nelle quali invece lo sviluppo fu scarso e la gelatina liquefatta dopo quattro giorni, mentre nelle altre due (n. 20 e 22) la gelatina tornò solida dopo una esposizione alla formalina rispettivamente di otto (n. 20) e di dieci (n. 22) giorni.

Secondo il Mavrojannis la gelatina fluidificata da un liquefaciente e risolidificata dal formolo, scaldata torna fluida; secondo l'Hauser invece essa resta permanentemente solida. Ho voluto vedere quale di queste due affermazioni così contraddittorie fosse la vera e ho potuto riscontrare che tutte e due contengono qualche cosa di vero, non già nel senso che la differenza del comportamento, per rispetto al riscaldamento, della gelatina solidificata dipenda dalla diversità delle specie batteriche in esame, ma, come risulta chiaramente dall'ultima colonna della tabella, nel senso che la gelatina fluidificata da uno stesso germe e poi risolidificata, alcune volte col riscaldamento torna a liquefarsi, altre volte resta solida, alcune volte infine si rammollisce un po' senza però diventare fluida.

Ho pensato che questo diverso comportamento potesse dipendere dalla diversa durata della esposizione alla formalina, nel senso che la gelatina più lungamente sottoposta all'azione del for-

molo, più formaldeidizzata, come diceva l'Hauser, non è liquefatta dal riscaldamento. Ho provato infatti a sottoporre nuovamente all'azione dei vapori di formalina della gelatina già da essi risolidificata e che col riscaldamento tornava a fondere; la gelatina dopo questa ulteriore esposizione ai vapori di formalina perdeva la proprietà di tornare a liquefarsi, anche se la capsula veniva collocata sui vapori di acqua bollente per parecchi minuti. Una sola eccezione, tra i batteri enumerati nella tabella, ho trovato a questa regola, e si riferisce al piocianeo; mentre la gelatina di una coltura a 37° C. di questo germe, fluidificata in due giorni e risolidificata dalla formalina in quattro giorni, non tornò fluida col riscaldamento (vedi n. 9), quella di una coltura a 24° C., risolidificata dalla formaldeide dopo un'azione di venti giorni (vedi n. 11), riscaldata tornò a liquefarsi ed esposta poi per altri cinque giorni ai vapori di formalina, tornò un'altra volta a liquefarsi col riscaldamento: riesposta per altri cinque giorni ancora, fu una terza volta fluidificata dal calore e così ancora una quarta ed una quinta volta, fino a che tutta la gelatina, in seguito alle forti perdite di acqua subìte per evaporazione in questi riscaldamenti, si ridusse a uno strato secco e raggrinzato.

Contro l'interpretazione che la mancanza di fusibilità della gelatina risolidificata dal formolo dipenda da una maggior durata di azione del formolo stesso, starebbe, apparentemente almeno, il fatto che non sempre a una maggior durata di esposizione alla formalina corrisponde la mancanza di fusibilità della gelatina; il più delle volte anzi si verifica precisamente il contrario, come si può constatare confrontando il n. 4 coi numeri 2 e 3, il n. 9 col n. 11, il n. 13 col n. 15, i numeri 23 e 24 col n. 22. Ma a parte il fatto che nella maggior parte di questi casi non si può stabilire un confronto fra numero e numero, perchè diverse furono per le colture di questi diversi numeri le condizioni di temperatura (vedi per es. i numeri 9 e 11, 13 e 15, 23-24 e 22) o del grado di alcalinità della gelatina (p. es. i numeri 3 e 4), per gli altri casi in cui tale confronto si può istituire (p. es. quello del 2 col 4, l'unico di tutta la tabella), osserverò che qui bisogna tener conto non di tutto il tempo che la gelatina rimase esposta ai vapori di formalina, ma solo di quello che ancora vi rimase dopo avvenuta la sua solidificazione; così per quel che riguarda i numeri 2 e 4, dirò che la gelatina del n. 2, divenuta solida dopo una esposizione di ben 24 giorni ai vapori di formalina e che riscaldata tornò a liquefarsi, sottoposta all'azione del formolo per un altro giorno soltanto, non

rifondeva più, neppure se esposta ai vapori di acqua bollente. È inutile avvertire che nel fare queste osservazioni bisogna provvedere a che l'ambiente nel quale si trovano le capsule di gelatina sia sempre saturo di vapori di formaldeide, affinchè costante per intensità sia l'azione di questa sulla gelatina.

Dalla tabella sopra riportata risulta come con tutti e cinque i campioni da me esaminati di *Vibrio cholerae* Koch, anche se coltivati alla temperatura di 20° C., sia nella comune gelatina nutritiva, sia in quella preparata secondo le prescrizioni di Abba, si possa non avere mai la risolidificazione della gelatina per opera del formolo. Gli stessi risultati ho ottenuto con le cinque differenti specie di vibrioni acquatili da me esaminati e di cui ho detto sopra. La sola differenza constatata è nella diversa rapidità di fusione della gelatina comune e della gelatina di Abba; mentre tutti e cinque i campioni di vibrione colerigeno fondono più rapidamente la prima, le cinque specie di vibrioni acquatili, eccezione forse fatta del vibrione n. III da me descritto, fondono più rapidamente la seconda. Ciò evidentemente dipende dal fatto che il vibrione del colera trova per il suo rigoglioso sviluppo un terreno nutritivo più adatto nella gelatina comune, la quale contiene anche del peptone e del sale, mentre i vibrioni acquatili si sviluppano meglio in un substrato più povero quale è la gelatina di Abba.

Un'ultima particolarità voglio ricordare a proposito di uno dei vibrioni acquatili che io ho isolati dall'acqua di Genova, e precisamente del vibrione cromogeno, il quale su tutti i comuni terreni culturali si sviluppa producendo una colorazione aranciata più o meno intensa; ciò accade anche per la gelatina. Orbene, la gelatina così colorata, sottoposta all'azione dei vapori di formalina, assume una colorazione rosso-vinosa. Tale fenomeno del cambiamento di colore nel pigmento prodotto da questo vibrione non si ripete per i pigmenti prodotti da altre specie cromogene di schizomiceti, ad esempio dallo stafilococco piogene citreo e dal *Micrococcus prodigiosus*. Veramente per quel che riguarda lo *Staphylococcus pyogenes citreus* dirò che il colore nelle colture in gelatina a 20°-25° C. (*optimum* di temperatura per la produzione del pigmento), nelle quali tutta la gelatina si è liquefatta, non è molto evidente; molto pronunciato è invece il colore rosso caratteristico delle colture di prodigioso, colore che non si altera affatto per l'azione del formolo. Nelle colture a 20°-25 C. del campione da me esaminato di *Bacillus pyocyaneus* e nelle quali tutta la gelatina si è fusa, il debole colorito verdastro della gelatina, dopo un giorno o due di esposizione

ai vapori di formalina, diventa leggermente arancione-sporco. Anche per questo germe dunque si ha un cambiamento di colore come per il vibrione cromogeno. È noto del resto come il colore del pigmento prodotto dal piocianeo sia diverso a seconda delle varietà e come per una determinata varietà possa cambiare e perfino mancare in alcuni substrati nutritivi.

***

Dopo questi risultati ottenuti con quegli stessi schizomiceti che il Mavrojannis colloca nella prima categoria, incapaci cioè di trasformare la gelatina fino al punto che la formaldeide non possa più risolidificarla, ho voluto estendere le mie ricerche ad altri schizomiceti liquefacienti la gelatina, per vedere se caso mai ve ne fosse tra essi qualcuno che di questa trasformazione fosse assolutamente incapace: non ne ho trovato uno solo. Gli schizomiceti da me esaminati furono, oltre i cinque vibrioni acquatili, di cui sopra, i seguenti: *Bacillus mesentericus fuscus, Bacillus megatherium*, *Bacterium vulgare* (*proteus vulgaris*), un *Vibrio phosphorescens* e *Micrococcus prodigiosus*. I risultati ottenuti per questi altri germi sono gli stessi di quelli ottenuti per i germi precedentemente esaminati e ritengo quindi inutile comporre per essi un'altra tabella: la gelatina da essi fluidificata è o no risolidificata dal formolo a seconda del tempo lasciato al germe per produrre una sufficiente quantità di enzima e a questo per esplicare tutta la sua azione; la gelatina risolidificata dalla formaldeide, a volte torna a fondere se riscaldata, altre volte invece resta permanentemente solida. Su un fatto soltanto voglio richiamare l'attenzione e cioè sul comportamento del *Micrococcus prodigiosus*. È noto come questo germe sia uno dei liquefacienti più rapidi e più energici, tra quelli anzi coi quali ho sperimentato io, esso è quello che alla temperatura di 20°-24° C. fluidifica la gelatina il più rapidamente: nelle comuni provette contenenti da 6 ad 8 cmc. di gelatina, questa è completamente fusa dopo soli 4 giorni di coltura a 20° C. circa. Se tale gelatina, che resta perfettamente fluida anche nell'acqua ghiacciata, si espone subito ai vapori di formalina, occorrono sette giorni perchè essa ritorni solida.

Non è dunque esatta, come legge generale per tutti i liquefacienti la gelatina, l'asserzione di Mavrojannis che la solidificazione della gelatina liquefatta da un fondente si compia tanto più rapi-

damente quanto più rapidamente si è compiuta la fluidificazione; basta infatti paragonare i risultati ottenuti col prodigioso con quelli ottenuti col vibrione del colera, p. es. nel n. 24 della tabella; mentre col prodigioso la fluidificazione si è compiuta in 4 giorni e la solidificazione in 7, col vibrione di Koch la fluidificazione si è compiuta, presso a poco alla stessa temperatura, in 12 giorni e la solidificazione in un giorno solo; la stessa osservazione si può ripetere consultando i risultati riferiti ai numeri 8 e 17 della tabella, relativi al bacillo del carbonchio e allo stafilococco piogene citreo, coltivati a 20°-24° C.

Ho voluto anche esperimentare con un batterio strettamente anaerobico e ho ricorso al bacillo del carbonchio sintomatico (*Bacillus Chauvoei*); anche per questo i risultati sono stati gli stessi.

Ho esteso inoltre le mie ricerche al gruppo delle streptotrichee e affini, e ho sperimentato sopra i tre seguenti germi: *Streptothrix dissenteriae*, *Actinomyces bovis* e *Achorion*; i risultati sono stati sempre gli stessi.

Infine ho voluto vedere se la proprietà di trasformare la gelatina in una sostanza non risolidificabile dal formolo spettasse anche agli enzimi prodotti da un germe liquefaciente, indipendentemente dalla attività delle cellule batteriche viventi. Ho preso perciò una coltura morta su agar a striscio di *Actimomyces bovis*, ho versato nella provetta della gelatina liquefatta e sterile e ho ripetutamente agitata la provetta stessa, poi l'ho tenuta per parecchi giorni in osservazione nel termostato a 37° C., senza constatare mai il più piccolo accenno a sviluppo; ciò non ostante la gelatina, messa nell'acqua diaccia, restava perfettamente liquida ed esposta ai vapori di formalina per oltre un mese, non ritornò solida; la fluidificazione della gelatina e la sua trasformazione in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide era dunque stata compiuta dagli enzimi prodotti dalle cellule sviluppatesi sull'agar e morte.

***

Quanto agli ifomiceti, già ho esposto i risultati ottenuti nei miei due lavori sopra citati. Le specie da me' esaminate, tutte liquefacienti la gelatina, sono state le seguenti: *Penicillium glaucum* Link, *Aspergillus niger* v. Tieghem, *Aspergillus varians* Wehmer, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Oospora verticillioides* Saccardo (*Oospora hyalinula*, *candidula*, ecc.). Per tutte queste

specie, eccezione fatta per l'*Aspergillus fumigatus*, io ho avuto gli stessi risultati ottenuti per gli schizomiceti liquefacienti; cioè se si lascia tempo all'ifomiceta di produrre l'enzima proteolitico in quantità sufficiente e all'enzima di esplicare completamente la sua azione. la gelatina fluidificata non è più risolidificata. E che anche all'enzima proteolitico degli ifomiceti spetti la proprietà di fluidificare la gelatina indipendentemente dalla presenza e dalla attività dell'ifomiceta stesso, ho stimato inutile il verificarlo, essendoci a questo proposito i bellissimi studi di Malfitano (V) sull'*Aspergillus niger* (1).

Il risultato da me ottenuto con l'*Aspergillus fumigatus* essendo diverso da quello osservato per tutti gli altri ifomiceti nominati e per tutti gli schizomiceti liquefacienti che sopra ho enumerato, ho voluto ripetere le esperienze con questo aspergillo, per vedere se anche per esso non si ripetesse il fatto che già avevo constatato per le specie batteriche ritenute dal Mavrojannis come incapaci di trasformare la gelatina in un prodotto non solidificabile dal formolo. Disponendo di tre campioni di *Aspergillus fumigatus* di provenienza diversa (uno dal granturco guasto di regioni pellagrose, uno dall'acqua potabile di Genova, e uno isolato da un coniglio a Roma. dal dott. Scaffidi, nel laboratorio di patologia generale) ho voluto anche vedere se questi tre diversi campioni presentassero qualche differenza costante nella rapidità di fluidificazione della gelatina e nel comportamento verso il formolo della gelatina fluidicata.

Ricorderò qui che l'*Aspergillus fumigatus*, coltivato alla temperatura di 20° C., fonde lentissimamente la gelatina, ma ciò dipende

(1) Ecco come procedeva Malfitano: in provette contenenti 5 cmc. di gelatina liquefatta (gelatina al 20% con 2 °/₀₀ di timolo) aggiungeva 10 cmc. di liquido proveniente da una coltura ben matura di *Aspergillus niger* in liquido di Raulin, mischiava bene e portava in un termostato a 35° C.; ogni ora metteva le provette per 10'-15' in acqua fredda a 15° C., e osservava quando la gelatina non si rapprendeva più; ciò accadeva dopo 12-20 ore. Con numerose esperienze l'A. ha potuto stabilire che la quantità di diastasi cresce con l'età della coltura e raggiunge il suo *maximum* quando il micelio entra in decomposizione, poi pare che sia lentamente distrutta. La secrezione di tale proteasi è un fatto costante della vita dell'*Aspergillus niger* e tutte le condizioni esterne che possono influenzarla agiscono prima direttamente sullo sviluppo del micelio. Due cose mi preme di far rilevare dallo studio dell'A., che cioè occorre del tempo perchè l'enzima proteolitico esplichi la sua azione, e che la rapidità della fluidificazione di una data quantità di gelatina è in rapporto diretto della quantità di diastasi che si fa agire sopra di essa. Nelle esperienze con le colture in gelatina occorre quindi dar tempo all'ifomiceta di produrre l'enzima in quantità sufficiente e all'enzima di esplicare la sua azione. Ricorderò anche che l'enzima prodotto dall'*Aspergillus niger* non esercita la sua azione proteolitica sulla gelatina se non in ambiente acido.

naturalmente dal fatto che a quella temperatura esso si sviluppa poco e quindi produce anche poco enzima. Il Wehmer che coltivava questa specie in gelatina al mosto di birra, con un contenuto in gelatina del 5 % soltanto e manteneva le sue colture a soli 15° C. e anche meno, trovò che essa non fluidificava affatto o quasi la gelatina. Ma già il Rénon aveva constatato che coltivando l'*Aspergillus fumigatus* a 22° C. la fluidificaztone contenuta in una provetta ordinaria è completa dopo un mese circa. Io coltivando questa muffa a 37° C. (che è l'*optimum* di temperatura per il suo sviluppo) ho visto che la gelatina contenuta in una comune provetta è fluidificata in 4-5 giorni soltanto (1).

Le esperienze ripetute adesso sono state condotte come le precedenti: dei tre campioni ho fatto due serie di colture, mantenute le une a 37° C., le altre a 24°-25° C. (gelatina al 15 % preparata secondo le prescrizioni di Abba); nella serie a 37° C. ho aggiunto le due solite provette di controllo, una di gelatina sterile e una di una coltura di tifo in gelatina. Nelle colture a 37° C. la fluidificazione della gelatina si è compiuta in 4-5 giorni e a partire dal giorno della fluidificazione, constatata come ho detto sopra, ho lasciato passare altri 14 giorni, tenendo sempre per tutto questo tempo le provette a 37° C., dopo di che ho esposto la gelatina all'azione dei vapori di formolo. Nelle colture a 24°-25° C. la fluidificazione completa di tutta la gelatina si è compiuta con rapidità molto diversa: in 22 giorni per il campione isolato dall'acqua, in 34 per quello dal granturco e in 48 per quello dal coniglio. Ho voluto vedere se questa forte differenza nella rapidità della fluidificazione della gelatina fosse un fenomeno accidentale o costituisse un fatto costante; ho quindi fatto delle altre colture nella stessa gelatina, mantenendole tutte alla stessa temperatura di 25°-26° C.; nella coltura del campione isolato dall'acqua la gelatina era completamente fluida dopo 20 giorni, in quella dal granturco dopo 33 giorni e in quella dal coniglio dopo 31 giorni; quest'ultimo campione dunque, che nella serie precedente aveva impiegato un tempo molto più lungo del secondo per fondere tutta la gelatina, impiegò nella seconda serie lo stesso tempo, anzi un po' meno. Naturalmente tutte le pro-

(1) Nei miei precedenti lavori (VIII e IX) è detto che l'*Aspergillus fumigatus*, coltivato a 37° C., fonde la gelatina in 7-8 giorni; la differenza dei risultati ottenuti allora e adesso dipende dal fatto che prima prendevo come data della avvenuta completa fluidificazione quella in cui la gelatina posta nell'acqua ghiacciata a 0° C. circa non si risolidificava più, e ora invece quella in cui non tornava solida a 10° C. circa.

vette erano delle stesse dimensioni e contenevano presso a poco la stessa quantità di gelatina. Dal giorno in cui avevo constatata la fluidificazione totale della gelatina ho lasciato passare altri 14 giorni per le colture della prima serie e 10 per quelle della seconda e poi ho esposto la gelatina ai vapori di formalina.

Nella serie delle colture a 37° C. la gelatina fluidificata da tutti tre i campioni non si è mai risolidificata, neppure dopo quattro mesi di esposizione continua ai vapori di formalina frequentemente rinnovata. Quanto alle colture a 25° C., in quelle della prima serie tornò solida dopo 24 giorni di azione della formaldeide la gelatina fluidificata dal campione proveniente dal granturco e dopo 32 giorni quella del campione isolato dal coniglio; nella seconda serie la gelatina liquefatta da questi due campioni tornò solida rispettivamente dopo 6 e 11 giorni, in un tempo cioè molto più breve; infine la gelatina liquefatta dal campione proveniente dall'acqua non tornò solida in nessuna delle due serie, neppure dopo quattro mesi di esposizione alla formalina.

Anche per questo ifomiceta dunque, come del resto per tutti gli altri ifomiceti da me studiati, si verifica quello che già ho riferito per gli schizomiceti, che cioè anch'esso è capace di trasformare la gelatina in una sostanza non più risolidificabile dalla formaldeide, purchè sia coltivato in condizioni di temperatura favorevoli alla formazione dell'enzima proteolitico; nel caso dell'*Aspergillus fumigatus* questa temperatura coincide con la temperatura *optimum* per lo sviluppo, che è circa 37° C. Anche però se lo si coltiva a questa temperatura, occorre lasciar passare molti giorni (12-15 circa) da quello in cui si è constatata la perfetta fluidificazione della gelatina, perchè il formolo non possa più risolidificarla; nelle mie precedenti esperienze io avevo lasciato trascorrere un numero di giorni minore e perciò avevo sempre visto tornare solida la gelatina.

Quanto alle colture ad una temperatura inferiore al punto di fusione della gelatina adoperata, anche per l'*Aspergillus fumigatus* vediamo ripetersi ciò che abbiamo già osservato per qualche schizomiceta, cioè la differenza di comportamento verso la formaldeide della gelatina fluidificata da campioni di provenienza diversa e il fatto che quanto maggior tempo si lascia trascorrere dal momento che si è constatata la fluidificazione completa della gelatina, tanto maggior tempo occorre perchè la formaldeide faccia tornare solida la gelatina stessa. L'esattezza di questa seconda osservazione è dimostrata dal confronto dei risultati della prima serie a 25° C. con quelli della seconda serie; quanto alla prima asserzione, possiamo dire che i tre campioni

di *Aspergillus fumigatus* si comportano in questo ordine crescente per rispetto alla rapidità con la quale a 25° C. circa trasformano la gelatina in un prodotto non più solidificabile dalla formaldeide, oppure, il che è lo stesso, in ordine decrescente rispetto alla rapidità con la quale la gelatina fluidificata torna solida per azione del formolo: 1° *Aspergillus fumigatus* da granturco; 2° *Aspergillus fumigatus* da coniglio; 3° *Aspergillus fumigatus* da acqua. Quanto al primo occorre far passare più di un mese (a 25° C. circa), oltre quello impiegato per la fluidificazione totale della gelatina, perchè questa non sia più risolidificata dalla formaldeide (1); quanto al secondo occorrono almeno 20 giorni; quanto al terzo invece bastano 10 giorni (2).

Nelle mie esperienze con la gelatina fluidificata dall'*Aspergillus fumigatus* coltivato a 25° C. e risolidificata dal formolo, essa, sottoposta al riscaldamento, è tornata quasi sempre fluida; anzi quasi sempre, sopratutto per il campione isolato dal granturco, ha presentato il fenomeno che ho già descritto per la gelatina fluidificata dal *Bacillus pyocyaneus*, cioè riesposta per quattro o cinque volte, per un periodo ogni volta di cinque giorni circa, all'azione dei vapori di formalina, riscaldata è tornata sempre liquida, fino a che non si è essiccata per la forte evaporazione.

Contemporaneamente alle esperienze ripetute per l'*Aspergillus fumigatus* ne ho fatte delle altre per una specie di *Penicillium*, che ho isolato dall'acqua potabile di Genova e che non ho potuto identificare con nessuna delle specie sommariamente descritte dal Dierckx nella sua nota preventiva sul genere *Penicillium*. Rimando ad altro luogo la descrizione dei caratteri morfologici e culturali di questa specie; qui dirò soltanto che essa fonde rapidamente la gelatina; coltivandola, per esempio, a 22°-24° C. in una ordinaria provetta di gelatina al 15 %, questa è completamente fluidificata prima di 15 giorni; esponendo dopo altri due o tre giorni ai vapori di for-

---

(1) Ciò spiega perchè nelle mie precedenti esperienze, fatte appunto con il campione isolato dal granturco, io abbia sempre ottenuto la solidificazione della gelatina da esso liquefatta. Il limite di un mese per questo campione e quello di 20 giorni per l'altro è stato da me stabilito con esperienze fatte dopo quelle qui sopra riportate.

(2) In complesso, a partire dal giorno in cui si fa l'innesto in gelatina, se questa è mantenuta a circa 25° C., perchè essa sia trasformata in un prodotto non più risolidificabile dai vapori di formalina, occorrerebbero per il primo campione due mesi circa, per il secondo quasi altrettanto (da 50 a 70 giorni), per il terzo un mese soltanto. Invece nelle colture a 37° C., per tutti tre i campioni, basterebbe circa mezzo mese o poco più.

malina la gelatina liquefatta, questa non torna solida neppure dopo tre mesi.

Ho voluto anche vedere se le diverse *varietà* di *Penicillium glaucum* Link si comportassero diversamente rispetto alla fluidificazione della gelatina. È noto come questa specie di muffa abbia, per gli studi del Gosio, acquistato una speciale importanza per le alterazioni del mais in rapporto alla eziologia della pellagra, ed è pure noto come il Di Pietro abbia sostenuto esservi una speciale *varietà* tossica e pellagrogena, ben distinta per i suoi caratteri morfologici, culturali e biologici, e come il Ceni e il Besta abbiano raggruppato tutte le *varietà* di *Penicillium glaucum* attorno a due *varietà* principali, anch'esse ben distinte per i loro caratteri morfologici, culturali e tossici. Probabilmente non si tratta qui di *varietà* nel senso vero della parola, ma soltanto di campioni di provenienza diversa e solo dotati di un diverso potere tossico. Senza addentrarmi però in tale questione, su cui tornerò altrove, e alla quale ho già accennato nel mio lavoro sulle muffe del granturco guasto, qui dirò soltanto che, rispetto alla fluidificazione della gelatina e all'azione del formolo sulla gelatina fluidificata, i diversi campioni di *Penicillium glaucum* da me esaminati, non si comportano tutti ugualmente: alcune volte la gelatina è fluidificata più rapidamente, altre meno (1); benchè tutti i campioni poi siano capaci di trasformare la gelatina in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide, talora si osservano delle differenze nella maggiore o minore attitudine a compiere questa trasformazione; insomma si ripete per queste così dette *varietà* quello che abbiamo visto verificarsi per campioni di provenienza diversa di altre specie di ifomiceti (p. es. dell'*Aspergillus fumigatus*) o di schizomiceti (p. es. del *Vibrio cholerae*).

Conclusioni.

1. Gli enzimi proteolitici prodotti dagli schizomiceti e ifomiceti fluidificanti la gelatina che io ho esaminati (18 specie di schizomiceti e 7 di ifomiceti, in tutto 25) sono tutti capaci di trasformare la gelatina in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide.

---

(1) Ciò era già stato osservato dal Di Pietro: la sua *varietà tossica* fluidifica la gelatina lentamente.

2. Non è quindi giusta la distribuzione, proposta dal Mavrojannis, degli schizomiceti liquefacienti in due categorie, comprendenti la prima i germi capaci di trasformare la gelatina soltanto in gelatosi (solidificabile dal formolo) e la seconda quelli capaci di spingerne la trasformazione fino almeno al grado di peptone (non solidificabile dal formolo).

3. Fra i diversi germi esistono soltanto delle differenze rispetto alla rapidità con la quale essi, in determinate condizioni di temperatura, substrato nutritivo, ecc., sono capaci di compiere la trasformazione della gelatina in un prodotto non più solidificabile dalla formaldeide.

4. La temperatura alla quale un dato germe compie più rapidamente e più facilmente tale trasformazione non coincide sempre con l'*optimum* di sviluppo del germe stesso; prima quindi di affermare che un germe è incapace di produrre tale trasformazione, bisogna coltivarlo a temperature diverse.

5. Generalmente però le specie patogene da me esaminate compiono più rapidamente tale trasformazione se coltivate a 37° C., che non a 20°-22° C.

6. La gelatina fluidificata da un liquefaciente e risolidificata dalla formaldeide, se viene riscaldata, alcune volte resta perfettamente solida, altre volte torna a liquefarsi, e qualche volta, infine, si rammollisce un po' senza diventare fluida; quindi le due asserzioni contradditorie dell'Hauser e del Mavrojannis contengono tutte e due qualcosa di vero, benchè nessuna delle due sia esatta.

7. Questo diverso modo di comportarsi, rispetto al riscaldamento, della gelatina fluidificata da un germe liquefaciente e risolidificata dalla formalina dipende probabilmente da tutte quelle condizioni che possono influire sullo sviluppo del germe e sulla produzione, per parte di esso, dell'enzima proteolitico. Che se queste condizioni furono identiche, allora il diverso comportamento dipende dalla diversa durata d'azione della formalina stessa, durata la quale naturalmente va computata dal momento in cui è avvenuta la solidificazione della gelatina.

8. Se infatti la gelatina, fluidificata da un germe liquefaciente, risolidificata dalla formaldeide e rifusa col riscaldamento, si espone nuovamente per qualche giorno ai vapori di formalina, scaldandola, generalmente non torna più a fondere. Ho riscontrato qualche eccezione a questa regola in alcuni campioni di gelatina fluidificata dal *Bacillus pyocyaneus* e dall'*Aspergillus fumigatus*, coltivati a 24°-25° C.

9. La rapidità con la quale la gelatina fluidificata da un germe liquefaciente può essere risolidificata dai vapori di formalina è diversa per campioni di provenienza diversa, anche quando si mantengano le stesse condizioni di tempo, temperatura, substrato nutritivo, ecc.; talvolta anzi si osservano delle variazioni anche per colture, fatte nelle identiche condizioni, di uno stesso campione.

10. Generalmente però, per uno stesso campione, e anzi per uno stesso germe, si verifica la legge, che quanto più a lungo, dopo avvenuta la perfetta e totale fluidificazione della gelatina, questa è lasciata alla temperatura di sviluppo prima di esporla all'azione del formolo, tanto maggior tempo questo impiega per risolidificarla. e anzi, al di là di un certo limite (limite variabile per ciascuna specie e per le condizioni di temperatura, ecc.), non è più capace di risolidificarla.

11. Non si può invece elevare al valore di legge generale. per tutti i germi liquefacienti la gelatina, l'asserzione di Mavrojannis. che cioè la solidificazione, per opera del formolo, della gelatina fluidificata da un liquefaciente avvenga tanto più rapidamente quanto più rapidamente è avvenuta la fluidificazione della gelatina.

12. Se si tratta di germi liquefacienti e cromogeni, il colore della gelatina liquefatta può, per l'azione dei vapori di formalina. alterarsi (p. es. bacillo piocianeo e vibrione cromogeno n. 2 di Tiraboschi) o rimanere inalterato (p. es. stafilococco piogene citreo e micrococco prodigioso).

13. La proprietà di trasformare la gelatina in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide spetta anche agli enzimi prodotti da un germe liquefaciente, indipendentemente dalla presenza e dalla attività del germe stesso.

14. Per quel che riguarda la tecnica da seguire in queste esperienze, farò qui notare soltanto che per istituire dei confronti e trarre delle conclusioni, è necessario che l'azione della formaldeide si esplichi sempre con la stessa intensità; quindi bisogna aver cura che lo spessore dello strato di gelatina fluidificata, sottoposta all'azione del formolo, sia sempre lo stesso in tutte le capsule e che l'ambiente sia sempre saturo di vapori di formaldeide.

BIBLIOGRAFIA.

1. BITTER. Archiv für Hygiene. Vol. V. pag. 247 (1886).
2. CACACE. *Ueber das proteolytische Vermögen der Bakterien*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª parte, Vol. XXX, pag. 244 (1901).
3. FERMI e PAMPERSI. *Se i microrganismi peptonizzino l'albumina*. Centralblatt für Bakteriologie, 2ª parte, Vol. XX, pag. 387 (1896).
4. HAUSER. Münchener medizinische Wochenschrift, Vol. XL, n. 30 e 35 (1893).
5. MALFITANO. *La protéolyse chez l'Aspergillus niger. Sur la protéase de l'Aspergillus niger*. Annales de l'Institut Pasteur, Vol. XIV, pag. 60 e 420 (1900).
6. MAVROJANNIS. *Das Formol als Mittel zur Erforschung der Gelatineverflüssigung durch die Mikroben*. Zeitschrift für Hygiene, Vol. XLV, pag. 108 (1903).
7. MILLER. *Ueber Gärungsvorgänge in Verdauungstractus*. Deutsche medizinische Wochenschrift, 1885, n. 49 (1885).
8. TIRABOSCHI. *Sopra alcuni Ifomiceti del mais guasto di regioni pellagrose*. Annali di Botanica del prof. R. Pirotta, Vol. VII, pag. 137 (1905).
9. TIRABOSCHI. *Note di tecnica ifomicetologica*. Questi Annali, Vol. XI, 1905, fasc. 1°, pag. 63.

Istituto d'Igiene della R. Università di Pisa

Di alcune proprietà biologiche dei filtrati rabici, in confronto con le emulsioni di sostanze nervose da cui provengono

NOTA

del Professor **A. DI VESTEA.**

Da quando il Pasteur ci dette di riprodurre la rabbia sugli animali di laboratorio in modo facile e sicuro, e di possedere per mezzo della loro sostanza nervosa centrale il virus di tale infezione, bensì in forma greggia, ma scevro d'altri germi e concentrato, furono tentate le più diverse vie per determinare l'intima natura del medesimo, fino quasi ad esaurire le risorse della comune tecnica batteriologica. Questo lavoro dura tuttavia, diviene anzi ogni giorno più febbrile; e se non può dirsi ancora di averci dato la soluzione del problema, ci ha messi in possesso di una serie di fatti positivi, per i quali è lecito oramai restringere a due le induzioni più vicine alla realtà: la ipotesi della *natura microzoica* e l'altra della *natura ultramicroscopica.*

La prima di queste ipotesi è stata messa innanzi da me fin dal 1894, allorchè dimostrai alla R. Accademia medico-chirurgica di Napoli (1) una serie di preparazioni microscopiche di tessuto nervoso di conigli infettati per la via del nervo sciatico, le quali facevano vedere, lungo la via seguita dal virus fino alla sezione lombare del midollo spinale, la presenza di elementi non confondibili con quelli propri del tessuto nervoso. La mia osservazione riguardava propriamente i tubulini nervosi dello sciatico, in corrispondenza del punto dell'inoculazione, e le grandi cellule motrici del corno ante-

riore; ma richiamavo in modo particolare l'attenzione sui primi. In mezzo al focolaio reattivo del tratto di nervo, sede dell'innesto. si vedevano singole fibre nervose contenere, in una dilatazione dello spazio tra guaina di Schwann e guaina mielinica, uno o anche più corpuscoli di aspetto *oviforme;* corpuscoli cioè costituiti d'un ampio nocciolo di materia grossamente granulare, tingibile col carminio, e di un doppio contorno a forma di guscio, punto o poco colorabile. Piacemi riprodurre la immagine fedele di cotesto reperto. fotografata da una preparazione che conservo ancora, perchè si sappia più precisamente quello che la mia nota del 1894 ha descritto e figurato (V. fig. 1).



Fig. 1. — Il fotogramma fa vedere nel centro la sezione trasversale d'una fibra del nervo sciatico (sede dell'innesto), che presenta ricacciato verso *b* il cilindrasse con la guaina mielinica. e contiene un *corpuscolo oviforme* nella dilatazione risultante, dall'altro lato *a*, tra la stessa guaina mielinica e la guaina di Schwann.

Punto di partenza di queste indagini era la conoscenza acquistata nei precedenti studi di patogenesi, fatti con Zagari e D'Abundo (2). *esistere uno stretto rapporto tra la forma clinica della infezione e la porta d'entrata del virus*, con decisa tendenza di questo a sistematizzarsi lungo l'asse cerebro-spinale; ciò che mi aveva fatto ardito di affermare, che forse un giorno lo studio morfologico della rabbia gioverebbe ai progressi dell'anatomia e della fisiologia del sistema nervoso istesso. Una così straordinaria elettività di sede parevami poco conciliabile con la natura dei comuni virus batterici, i quali sogliono diffondersi nei liquidi circolanti o proliferare nei tessuti di sostanza connettiva, e per contrario molto rispondente all'indole dei microparassiti della serie animale, che vediamo regolarmente prediligere le formazioni istologiche più evolute (corpuscoli rossi. epiteli, fibre muscolari, cellule ovariche, ecc.).

Nella mia ricerca di carattere micrografico mi arrestai innanzi alla difficoltà di non avere a disposizione una tecnica spedita e

sicura, che desse di ritrovare facilmente gli elementi osservati, soprattutto i *corpuscoli oviformi*, nelle comuni emulsioni di sostanza nervosa rabida. Per la qual cosa, riprendendo questi studi or sono tre anni, rivolsi la mia industria a ricercare un liquido virulento povero di elementi istologici comuni; e fu così che dopo infruttuose indagini sopra il liquido cerebro-spinale e l'umor acqueo, tentai la filtrazione amicrobica e m'imbattei nella dimostrazione del fatto, che il virus della rabbia rientra nella categoria dei virus propriamente detti *filtrabili* (3).

Nel frattempo erano comparsi gli interessantissimi studi del Negri, a cui ha tenuto dietro via via tutta una serie di lavori confermanti l'esistenza dei *corpi* che oggi vanno col nome di lui (Daddi, Pace, D'Amato, Volpino, Bertarelli, Luzzani, Luzzani e Macchi, Abba e Bormans, ecc.). Tali corpi rilevabili particolarmente dentro le grandi cellule del corno d'Ammone e della corteccia cerebrale e cerebellare, sono stati dallo scopritore indicati come *sporozoi specifici;* ma non tutti gli osservatori dividono questa interpretazione, basata solo sulla grande costanza del reperto, mentre è unanime l'accordo circa la loro importanza diagnostica (4). Contribuisce a mantenere sospeso il giudizio, circa l'intima natura dei *corpi* in parola, la loro spiccata reazione acidofila, non che la difficoltà di ritrovarli in tutte le parti del sistema nervoso che sono sede indubbia del virus e in numero proporzionato al grado rispettivo di virulenza. E così, mentre da una parte le industriose microreazioni del Volpino fanno vedere nell'interno dei *corpi di Negri* qualcosa meglio conciliabile col carattere istologico d'un elemento microparassitario, rilevando la esistenza di minuscole forme basofile e neutrofile (5); d'altra parte il D'Amato, deponendo nello spazio subdurale del coniglio un frammento di corno d'Ammone ricchissimo di *corpi di Negri*, osserva che, pur avendosi diffusione del virus nelle parti prossime della massa cerebrale, in quelli non si nota alcuna modificazione di carattere evolutivo (6).

Resta quindi ancora da indagare circa l'intima natura di questo reperto del Negri, per quanto esso si annunzi come un gran passo verso la soluzione del difficile problema, e come un fatto che accentua più che mai il concetto della esistenza prevalentemente *intracellulare* o *intraelementare* del virus rabico. Al quale concetto ha dato pure testè un notevole contributo il Nitsch di Cracovia, mercè le sue molte ricerche sperimentali tendenti a dimostrare, che il virus della rabbia esiste incomparabilmente più copioso nella sostanza *grigia* dei centri nervosi, che non nella *bianca* (7).

Abbiamo, intanto, come un fatto perentoriamente acquisito alla scienza la nozione, che questo virus *è filtrabile* (secondo una espressione convenzionale oramai divenuta di uso comune), ossia capace di passare sotto certe condizioni attraverso i filtri amicrobici; e tale constatazione, fatta in maniera indubbia primamente dal Remlinger e da me, a pochi giorni d' intervallo l'uno dall'altro (*), ha offerto facile addentellato a mettere in mezzo l'altra ipotesi della probabile *natura ultramicroscopica*.

Per me questa maniera di vedere è prematura, e trovomi d'aver prevenuta l'affermazione in proposito specialmente dello Schüder e del Remlinger, scrivendo fin dal primo annunzio delle mie esperienze di filtrazione, non essere logico dedurre senz'altro dal carattere della filtrabilità il concetto della ultramicroscopicità, avendosi già nel *micromonas Mesnili* l'esempio d'una specie vivente (e per giunta della famiglia dei protozoi), benissimo osservabile con i comuni mezzi ottici e non di meno filtrabile (3). Evidentemente è filtrabile ogni elemento ultramicroscopico; ma non può valere la proposizione inversa. E a ribadire la tesi, in una pubblicazione successiva (8) aggiunsi l'esempio della sospensione di ciglia di batteri, secondo preparasi dal mio aiuto De Rossi per lo studio dei fenomeni di agglutinazione. Una sospensione pura di ciglia è affatto paragonabile al filtrato rabico, e per la sua apparente limpidezza, e per essere a sua volta filtrabile attraverso la candela Berkefeld V, e per non lasciar nulla distinguere al microscopio in preparati a fresco; ma se ne distingue per la circostaza, che con la colorazione specifica vediamo nel relativo filtrato numerosissimi e distintissimi i brandelli cigliari: chi può dire oggi, che non si riesca qualcosa a vedere con particolari microreazioni cromatiche anche nel filtrato rabico?

Più giustamente sul nuovo dato della filtrabilità del virus rabico sorge opportuno il desiderio di sapere, se i filtrati rabici contengono tutto intero il virus, quale si trova nelle comuni emulsioni di sostanza nervosa da cui quelli derivano.

Che io sappia, nessuno fin qui si è posto questo quesito, astrazion facendo da un semplice accenno di Bertarelli e Volpino. Questi due osservatori, a riguardo dell'affermazione di Schüder che i corpi di Negri non abbiano nulla di comune col virus della rabbia, appunto per il carattere filtrabile del medesimo, proposero di sperimentare,

(*) V. questi Annali, fasc. I, dell'annata corrente.

se, riprendendo quello che resta sul filtro per rifiltrarlo di nuovo, e ciò per un gran numero di volte, si riesca o non a esaurire la virulenza d'un dato materiale rabico. Non mi consta però, che essi sieno riusciti mai a produrre alcuna prova positiva di ciò. Mi trovo di avere tentato anch'io lo stesso sperimento; ma ne ho riportato la persuasione, trattarsi d'un vero lavoro di Danaidi, incapace di condurre a risultato soddisfacente. Invece ho creduto si potesse molto più semplicemente risolvere il quesito per una via indirétta; cioè saggiando, a parità di condizioni, il grado di resistenza vitale del filtrato e dell'emulsione da cui esso proviene. Ciò ho fatto da più punti di vista: ho esaminato parallelamente l'emulsione-madre e il filtrato rispettivo:

1. Dal punto di vista della loro conservabilità, così in mezzo acquoso semplice, come in mezzo idroglicerico;
2. Dal punto di vista della temperatura di sterilizzazione, egualmente in mezzo acquoso semplice o glicerinato;
3. Dal punto di vista della *influenza della congelazione.*

Premetto alla esposizione dei risultati alcune note di tecnica.

La emulsione per la preparazione del filtrato soglio ottenerla tagliuzzando in un mortaio 3-4 grammi di midollo spinale o di cervello, triturando e disgregando accuratamente con la interposizione d'una finissima sabbia quarzosa pura, poi stemperando pian piano in circa 70-100 parti d'acqua distillata, infine lasciando riposare per mezz'ora in un bicchiere a calice.

La filtrazione si è eseguita per mezzo dell'apparecchio di Chamberland, a pressione non maggiore di due atmosfere, servendomi delle candele Berkefeld V, nuove o vecchie che fossero, purchè provate previamente capaci di filtrare l'acqua potabile, alla cadente di un metro, con una velocità oraria di almeno m. 0.200, e rifiltrando quante volte il primo prodotto non si presentasse abbastanza limpido.

Le prove di resistenza al calore si sono fatte a bagnomaria, nel quale si tenevano immerse simultaneamente per 10′ o più due provette uguali a pareti sottilissime, con nel fondo l'una 1 cmc. di emulsione e l'altra 1 cmc. di filtrato. Tenendosi a bagno solo il terzo inferiore delle provette, si aveva cura di portare in fondo il materiale mercè apposita pipetta: così evitavasi il bagnamento delle pareti e si aveva la sicurezza di attingere poi, per le inoculazioni di controllo, un materiale scevro di particelle non assoggettate alla temperatura di prova.

La resistenza alla congelazione si è saggiata tenendo immerse in un miscuglio di ghiaccio e sale (circa — 17°) diverse provette preparate suppergiù come nel caso precedente, contando il tempo dal momento in cui il liquido rispettivo mostravasi affatto solidificato e lasciando poi sgelare nella incubatrice a 37°.

Infine le inoculazioni di controllo sono state eseguite nei conigli trapanati, avendo cura d'iniettare in ciascuna prova comparativa una quantità di *virus filtrato* sempre superiore a quella presunta attiva in condizioni naturali.

Riproduco succintamente nella Tavola I i risultati della maggiore parte delle prove fatte e vengo senz'altro alle conclusioni, notando una volta tanto che *ho sperimentato solo su virus fisso*, e propriamente con un esemplare capace di dare la rabbia nei conigli trapanati dopo un'incubazione di 4-5 giorni.

I. Il virus filtrato *perde presto* (nel giro di una settimana o poco più) *la sua virulenza*, anche conservato nelle migliori condizioni di temperatura, assenza d'ossigeno, oscurità e purezza batterica, mentre è risaputo che il virus ordinario resiste a lungo anche in materiale putrefatto.

II. La glicerina, nota per la sua proprietà conservatrice del virus rabico dentro i pezzi di tessuto nervoso, *non influisce ad allungare significantemente il sopraindicato periodo di conservabilità del virus filtrato.*

III. La temperatura di 50° C. *sterilizza in 10' il filtrato rabico*, mentre non toglie la virulenza alla emulsione-madre in un tempo doppio e triplo.

IV. Con l'aggiunta di una proporzione 20 % di glicerina, che non influisce a rendere sterilizzante per l'emulsione la stessa temperatura di 50° applicata per 10', *si abbassa a 45° la temperatura di sterilizzazione* (a parità di tempo) *del filtrato.*

V. Il virus filtrato, fatto congelare in miscuglio di ghiaccio e sale e messo anche subito dopo a disgelare, *si trova destituito di virulenza*, mentre l'emulsione tenuta congelata in pari condizioni si riscontra virulenta anche dopo due ore.

***

Mi son fatto la domanda, se cotesta minore resistenza degli elementi attivi del filtrato rabico non dipenda dal trovarsi essi sospesi in mezzi eccessivamente acquosi, capaci di dare luogo a intensi fenomeni di pressione osmotica, che l'influenza dello scaldamento esagererebbe a tutto danno della loro vitalità. Ho creduto di poter eliminare cotesto dubbio, verificando i medesimi fatti in soluzioni *ipertoniche* di cloruro di sodio. Per tanto risultano evidenti due importanti corollari dalle mie esperienze, provate e riprovate:

a) *Che i filtrati rabici non contengono intero il virus della rabbia;*

b) *Che sopra gli elementi attivi dei medesimi filtrati non si smentisce la virtù alterante della glicerina*, la quale sappiamo esercitarsi via via più forte sulle forme adulte dei microbi, non sì tosto ci allontaniamo dalle piccolissime proporzioni ritenute di importanza alimentare.

Numero d'[…] delle esperienze d[…]	[…] 10 minuti a 50° C		dopo 10 minuti a 45° C		Emulsione a 50° C dopo	
	[…]ne	Filtrato	Emulsione	Filtrato	20 minuti	30 minuti
a) Virus natur[…]						
XXII	[…]1	$(-)^{0.1}$	....	...	....	....
XXIII		$(-)^{0.2}$	....	....	....	....
XXIV	[…]$\frac{6}{8})^{0.2}$	$(\frac{6}{7})^{0.2}$ $(\frac{6}{8})^{0.2}$	....	....	....	....
XXV		...	....	....	....	....
XXVI		....	....	....	....	....
XXVIII		....	....	....	....	....
XXIX	[…]1	$(-)^{0.1}$	....	...	....	....
XXX	[…]2	$(-)^{0.2}$ $(-)^{0.2}$	....	....	....	....
XXXII	[…]2	$(-)^{0.4}$ $(-)^{0.4}$	....	...	....	...
XXXIII	[…]2	$(-)^{0.4}$ $(-)^{0.4}$	....	....	$(\frac{5}{7})^{0.2}$	....
XXXIV		....	....	...	$(\frac{5}{7})^{0.1}$	$(\frac{5}{7})^{0.1}$
b) Virus addiz[…] cerina (20 %[…]						
XXVIII		...	....	....	....	....
XXIX	[…]$\frac{6}{7})^{0.1}$	$(-)^{0.1}$ $(-)^{0.1}$	....	....	....	....
XXX	[…]$\frac{6}{7})^{0.1}$	....	....	$(-)^{0.2}$ $(-)^{0.2}$	....	....
XXXI	[…]$\frac{6}{8})^{0.2}$	....	....	$(-)^{0.4}$ $(-)^{0.4}$	....	....

(*) I risultati[…]l'innesto subdurale. L'esponente sta a significare la quantità in cm^3 del materiale inoculato.

La seconda di queste proposizioni mi appare tanto più legittima, perchè in una serie d'osservazioni collaterali, ho potuto verificare che la glicerina spiega proprietà conservatrice sul virus rabico destro i pezzi di tessuto nervoso, integro o grossamente frantumato, in ragione del grado di sua concentrazione: non per nulla si è sempre trovato praticamente utile alla conservazione dei midolli rabici la glicerina *anidra!* Or mi par chiaro che il diverso comportamento della glicerina, secondo il virus della rabbia è di quello messo a nudo con lo schiacciamento e la filtrazione ovvero di quello ancora custodito nella traccia del tessuto nervoso, ha tutto il significato d'un controllo al concetto della *esistenza intraelementare*, indiziata dalle indagini micrografiche o sperimentali mie, del Negri e del Nitsch.

La prima proposizione poi va intesa nel senso, che passano per i filtri amicrobici le forme del virus rabico *meno resistenti*. Or se si pensi, che in batteriologia siamo abituati a considerare *le forme più ridotte* di una stessa specie microbica regolarmente *dotate di una maggiore tenacità di vita*, il fatto inverso nel caso del virus rabico aggiunge credito alla supposta *natura non batterica* del virus stesso e richiama suggestivamente al pensiero la minore resistenza, che le forme *giovani* di certi microzoi parassiti presentano, a petto di altre forme generate con un tipo diverso di riproduzione.

L'argomento mi pare assai più valido di quello che si è dedotto dalla credenza, che il virus rabido, nella sua individualità naturalistica, sia di una grande labilità vitale a petto dei batteri.

Su questo modo di vedere ha insistito negli ultimi tempi particolarmente il Celli, basandosi sui risultati di esperienze di molti anni fa (9), istituite propriamente allo scopo di studiare il problema della disinfezione. Da tali esperienze egli era condotto a giudicare, che « la tenacità di vita del virus della rabbia non sia molta, ma piuttosto analoga a quella di batteri patogeni non sporigeni »; e avendole ripetute testè col De Blasi trova, per esempio, che a 45° C. il virus resta distrutto già dopo 12 ore, laddove a 55°, 60° bastano rispettivamente 60, 30 minuti (10). Il Galtier avrebbe visto in precedenza, che bastano anche 10 e talora 5 minuti per rendere inattivo il virus alla temperatura di 47°–48° (11). Recentemente il Bertarelli (12) ha trovato sterilizzante la temperatura di 60° in 10′, quella di 50° in 25′–45′, quella di 45° (una sola esperienza) in 30′.

Notoriamente i limiti di resistenza al calore di una specie microbica non sono assoluti, ma dipendono in certa parte dalle particolari condizioni in cui l'osservatore si mette, e che non sempre

sono riferite minutamente. Io sperimentando, come dissi già, con virus di passaggio, ho cercato di ridurre molto la massa del virus (1 cmc. di fina emulsione), perchè fosse rapidamente penetrata dal calore del bagno di prova; ed ho trovato così, che laddove il virus intero resta sempre attivo dopo esposto per 10′, 20′, 30′ alla temperatura di 50°, con o senza aggiunta di glicerina, invece il virus filtrato regolarmente in 10′ si perde (*), e per l'aggiunta di glicerina non resiste in pari tempo neppure a 45°. Ora a me pare, che dopo questi saggi comparativi dimostranti nell'agente specifico della rabbia un doppio modo di esistenza naturale, convenga ridurre l'affermata sua labilità a più corretta espressione, dicendo che non il virus rabico nella sua individualità naturalistica, ma *una forma* o *stadio particolare* di esso (elementi filtrabili) offre condizioni di resistenza eccezionalmente sfavorevoli. Questo modo di giudicare si dimostra tanto più logico, in quanto che la perdita della resistenza a 45° in 9-12 ore, rilevata testè da Celli e De Blasi nel materiale rabico ordinario, non ci allontana veramente molto dal grado di tenacità vitale, che il primo di questi osservatori aveva definito paragonabile suppergiù a quella dei batteri patogeni non sporiferi. Sappiamo, per esempio, che lo Sternberg ha trovati inattivi il pus blenorragico e lo pnemococco dopo soli 10′ di esposizione, rispettivamente a 60° e 52° C.; che Ficker ha visto morire il vibrione colerigeno a 45° in meno di 2 ore e perfino dopo 20′; che Pfeiffer e Beck hanno constatato la morte del bacillo influenzale alla temperatura di 60° dopo soli 5′, ecc. (13).

***

Le nuove proprietà da me accertate nel virus della rabbia fanno evidentemente pensare a uno sdoppiamento morfologico del presunto microparassita, e mi dànno di ribadire un pensiero espresso già in precedenti comunicazioni, circa l'indirizzo da tenere nell'esame del difficile problema riguardante la determinazione dell'intima natura di esso. Tali proprietà si sommano e ingranano, a mio modo di vedere, con quelle già note circa la diffusione a tappe del virus rabico lungo le vie nervose, offrendo un doppio prezioso mezzo di controllo a chi si occupa dello studio di esso dal punto di vista morfologico.

(*) Le due o tre eccezioni a questa regola, risultanti dalla lettura della Tavola I, si perdono di fronte alla costanza del fenomeno in tanti casi, e terranno probabilmente a qualche errore di osservazione o di registrazione.

Fintanto che non sia dato di sottoporre i reperti microscopici meglio indiziati all'*experimentum crucis* della coltivaziene artificiale, è giocoforza tenere per la loro esatta interpretazione una via indiretta, ma non meno rigorosa, pari a quella illustrata dal Golgi nello studio della malaria. Trattasi cioè di mettere in bella luce una regolare corrispondenza tra le fasi nosologiche del processo infettivo, e le fasi morfologiche del presunto virus; ciò che nel caso nostro ritengo sia attuabile, molto opportunamente, con lo studio della rabbia sperimentale del coniglio ottenuta per via nervosa, potendosi interrompere il processo infettivo al punto di avere, sopra uno stesso animale, tratti di tessuto nervoso già penetrati dal virus e tratti non per anco da esso raggiunti, o all'inizio della sua comparsa. Ricordo, tra l'altro, due momenti della vita del coniglio inoculato nel nervo sciatico, che dovrebbero presentarsi particolarmente adatti: cioè, il momento in cui il virus è dimostrabile non oltre il segmento dorsale del midollo spinale, e l'altro un poco più tardivo, in cui lo si trova arrivato al verme cerebellare o alla porzione anteriore del lobo temporo-frontale del cervello, ma non ancora al lobo occipitale. — Ciò da una parte. D'altra parte la dimostrazione di due diverse condizioni di resistenza vitale, quale mi risulta dalle recenti ricerche sul virus intero e sul virus filtrato, pone un'altra esigenza; giacchè è logico pensare, che debbasi poter chiedere al microscopio la dimostrazione, nel presunto microparassita specifico, di due distinti modi di essere, atti a mettere sulle tracce d'un particolare ciclo biologico.

INDICAZIONI BIBLIOGRAFICHE.

1. A. Di Vestea. Atti della regia Accademia medico-chirurgica di Napoli, 1894.
2. Di Vestea e Zagari. *Sulla trasmissione della rabbia per la via dei nervi* (La Psichiatria, 1887; Annales de l'Institut Pasteur, 1889).

— Di Vestea. *Sulla teoria nervosa della rabbia.* (Giorale internazionale di scienze mediche, 1890).

— Di Vestea e D'Abundo. *Contributo allo studio delle vie di connessione del sistema nervoso mercè la rabbia sperimentale.* (Annali di nevrologia, 1903).

3. A. Di Vestea. *Dei più recenti studi sopra la natura del virus rabido.* (Giornale Italiano delle scienze mediche, 1903, nn. 6-7).
4. A. Negri. *Contributo allo studio dell'eziologia della rabbia.* (Bollettino della Società medico-chirurgica di Pavia, 27 marzo 1903).

— G. Daddi. *Sull'eziologia dell'idrofobia.* (Rivista critica di Clinica medica, anno IV, n. 22, 1903).

— G. Volpino. *Sopra alcuni reperti morfologici nelle cellule nervose di animali affetti di rabbia sperimentale.* Comunicazione preliminare. (Giornale regia Accademia medica di Torino, seduta 3 aprile 1903).

— E. Bertarelli e G. Volpino. *Ricerche ed osservazioni sperimentali sulla rabbia.* Nota 1ª. (Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1903).

— D'Amato. *Sull'eziologia della rabbia.* (Atti del Congresso di medicina interna. Padova, 1903).

— Pace. *Osservazioni e ricerche sulla rabbia.* (Atti del XIII Congresso di medicina interna. Padova, 1903).

— Luzzani. *La dimostrazione del parassita specifico in un caso di rabbia nell'uomo.* (Bollettino della Società medico-chirurgica di Pavia, 1904. Seduta del 22 gennaio).

— L. Luzzani e Macchi. *Sulla diagnosi della rabbia.* (Gazzetta Medica italiana, 1904, n. 25).

— Abba e Bormans. *Sur le diagnostic histologique de la Rage. Annales de l'Institut Pasteur*, 1905.

5. Volpino. *Sulla struttura dei corpi descritti da Negri nella rabbia.* (Archivio per le scienze mediche, 1904).

— G. Volpino. *Sulla struttura dei corpuscoli contenuti nell'interno dei corpi di Negri.* (Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1904).

6. D'Amato. *I corpi di Negri in rapporto all'eziologia e alla diagnosi della rabbia.* (Riforma Medica, 1904).

7. R. Nitsch. *Expériences sur la Rage de laboratoire (virus fixe).* Bulletin de l'Académie des sciences de Cracovie, déc. 1904.

8. A. Di Vestea. *Ulteriori osservazioni circa la filtrabilità del virus rabido.* La Medicina Italiana, 1904, n. 13.

9. A. Celli. *Alcune proprietà del virus rabico.* (Bullettino della regia Accademia medica di Roma, 1887).

10. D. De Blasi. *Contributo alla conoscenza dei virus filtrabili.* (Annali di igiene sperimentale, 1904, fasc. III).

11. Nocard et Leclainche. *Les maladies microbiennes des animaux*, t. 2.me pag. 471, Paris, 1903.

12. E. Bertarelli. *Sui rapporti fra le modificazioni di virulenza del virus rabido e le modificazioni dei corpi di Negri.* (Rivista d'igiene e sanità publica, 1903).

13. Ottolenghi. *I batteri patogeni in rapporto ai disinfettanti.* Torino, 1899.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI NAPOLI

Il tachiolo nella disinfezione degli erbaggi

pel dottor **SALVATORE CAPPELLANI.**

È nota già l'importanza degli erbaggi (quelli in ispecie che vengono usati freschi nell'alimentazione) per la diffusione di malattie infettive, che hanno dal tubo gastro-enterico il loro punto di partenza. È questo un argomento che ha preoccupato già da parecchi anni la mente dei batteriologi.

Così il Galippe, Fernbach, Di Vestea, Fazio, Ceresole, Biancotti e parecchi altri, hanno studiato qualitativamente e quantitativamente i batteri che si possono riscontrare nelle ortaglie, provenienti dai mercati o direttamente dal terreno in cui sono coltivati. Per quanto non siano state confermate le vedute del Galippe, il quale ammetteva che sempre i microrganismi contenuti nel suolo, penetrino nella trama propria del tessuto vegetale, pur tuttavia i batteriologi si accordano nell'ammettere, che batteri di varia natura possano depositarsi negl'interstizi degl'involucri e delle foglie, in quelle parti, in ispecie, che vengono a contatto diretto col suolo, coi concimi, con le acque d'irrigazione.

Grancher e Deschamps difatti affermano, in base alle loro ricerche, che mai i bacilli del tifo, coi quali essi istituirono le loro esperienze, penetrarono nell'interno delle piante, ch'essi avevano coltivato in terreno, su cui avevano disseminato culture in brodo di tifo. Dello stesso avviso è il Rubner, mentre Ellroth assicura che, quando le radici presentano delle soluzioni di continuo, sia facile la penetrazione dei batteri nell'interno dei tessuti.

Klauditz, con una serie di esperienze sistematiche, è venuto alla conclusione, che i bacilli del tifo si soffermano sempre sulla superficie esterna delle piante, a cui, però, aderiscono così fortemente, da non poterne essere allontanati da un semplice lavaggio, per cui ad eliminare il pericolo di trasmissione di malattie d'infezione, non basta lo sciacquamento, per quanto prolungato esso possa essere.

Considerati e vagliati bene tutti i risultati ottenuti dagli autori che si sono occupati dell'argomento, pare che in linea di massima

si possa ritenere, che i batteri patogeni depositati sulla superficie degli erbaggi, e non quelli che potrebbero eventualmente penetrare nell'interno dei tessuti, siano da temere nella trasmissione delle malattie.

Se ciò è vero, la profilassi più utile è quella che consiglia la distruzione dei batteri, prima che, insieme con gli alimenti, vengano introdotti nell'organismo umano.

Epperò mentre un numero straordinario di mezzi e di sostanze furono escogitati per la sterilizzazione delle acque, ben poco si è pensato a quella delle verdure. Per queste, molti ritengono sufficiente un lavaggio, più o meno prolungato, con acqua comune, mentre altri consiglia l'uso di qualche disinfettante: così è stato ritenuto abbastanza efficace l'uso dell'acido tartarico. Oggi vien preparato, e messo in luce dal Paternò, il tachiolo (fluoruro d'argento) il di cui valore antisettico e disinfettante è stato sperimentato sia nel campo dell'igiene, come in quello della pratica medica e chirurgica.

Stando alle numerose ricerche fatte dal Paternò e Cingolani, l'acqua disinfettata col tachiolo, alla diluizione di uno a quattro o cinquecento mila, raggiungerebbe quasi un grado di completa sterilizzazione.

Le ricerche del Biancotti, di Inghilleri, di Paladino, per quanto variino in qualche cifra, si accordano in generale nell'assegnare al tachiolo un valore disinfettante molto elevato: il Paladino conclude col dire che, per quanto non si possa parlare di sterilizzazione delle acque, con l'uso del tachiolo, si può raggiungere però una depurazione notevole, essendo il migliore depuratore chimico fino ad ora conosciuto.

Nelle esperienze che ho accuratamente eseguite e che verrò subito a descrivere ho cercato di vedere, fino a che punto, nella depurazione delle ortaglie, ci si può giovare dell'uso di questo preparato, le cui proprietà sono tanto magnificate.

In due matracci *A* e *B* con cento cmc. di acqua distillata e sterilizzata, ho introdotto un certo numero di piantine d'indivia (*cichorium endivia*), così come veniva dal mercato, ed ho agitato molto intensamente in modo da praticare un lavaggio, per quanto più possibile, completo di esse, e da ciascuno dei due matracci ho prelevato con pipetta sterile, $^1/_2$ cmc. di acqua e versato in tubi di cultura contenenti 10 cmc. di agar nutritivo e quindi in iscatole di Petri. Ciò fatto ho aggiunto al matraccio B 1 cmc. della soluzione di tachiolo 1 $^0/_0$, in modo da avere ivi una diluzione di esso all' 1 $^{00}/_{00}$; metà delle piantine prelevate con pinza sterile e spremute per bene ho introdotte in

un matraccio, (B'), con 50 cmc. di acqua distillata e sterilizzata dopo 2'; e l'altra metà, dopo 5', in un altro matraccio, (B''). La stessa pratica è stata seguita per metà delle piantine del matraccio A, che furono passate in un matraccio (che chiamo per brevità A') con 50 cmc. di acqua sterile. Al matraccio A non è stato aggiunto però il disinfettante, dovendo l'acqua di esso servire come controllo. Da questa seconda acqua di lavaggio (A') e dai due matracci B' e B'' è stato preso $^1/_2$ cmc. e versato in tubo di agar e quindi in iscatole di Petri.

Lo scopo di queste ricerche si era quello di vedere, almeno con una certa approssimazione, quanti e quali germi rimanevano aderenti alle piantine e capaci di sviluppo dopo l'azione del disinfettante, messi in confronto degli altri, che si sviluppavano dalle altre piantine, che avevano subito solo un lavaggio in acqua semplice.

Ecco, in breve riassunto, il risultato delle esperienze:

Dopo 24 ore si svilupparono nell'acqua di lavaggio del

matraccio A	colonie	21,696
» B	»	19,715
matraccio A'	colonie	19,871
» B'	»	172
» B''	»	89

Fatto l'esame qualitativo delle colonie sviluppate dall'acqua di questi due matracci, ho notato quasi esclusivamente colonie di mesentericus, radiciforme e qualche colonia di b. sottile.

Ho ripetuto una seconda volta l'esperimento, prolungando però questa volta la permanenza delle pianticelle nella soluzione di tachiolo per 10', 20', 40' e ciò nella speranza di poter avere la completa distruzione dei germi, che si trovavano su di essi attaccati, risultato, che invero non si potè raggiungere. Infatti potei contare nel

matraccio A	colonie	24,677
» B	»	28,345
» A'	»	16,943
» B' (dopo 10')	»	218
» B'' (dopo 20')	»	178
» B''' (dopo 40')	»	86

In questa serie di esperienze però, io ho fatto agire il disinfettante in acqua distillata, in un mezzo affatto speciale, che difficilmente viene adoperato in pratica per lavare gli erbaggi.

A me correva l'obbligo di tener conto di questo fatto, dappoichè è già noto a tutti, come l'azione di un disinfettante chimico, possa essere influenzata dalla presenza, nel mezzo da disinfettare, di determinate sostanze. E nel caso in ispecie, essendo il tachiolo un composto d'argento avrebbe potuto benissimo, in presenza di clorури e sali solubili di calcio, essere precipitato sotto forma di sale in-

solubile. In quest'ordine d'idee ho ripetuto l'esperimento con acqua di Serino, la quale contiene una certa quantità, per quanto non molto rilevante, di sali terrosi: è povera però di cloruri, non contenendone che la quantità corrispondente a 0,0073 di cloro per litro.

La tecnica seguita è stata perfettamente identica a quella delle precedenti esperienze: mi limito quindi a riassumere sulla tabella i risultati:

matraccio	A	colonie	29,852
»	B	»	19,572
»	A′	»	13,894
»	B′ (dopo 20′)	»	209
»	B″ (dopo 40′)	»	115

Anche in questo caso le colonie isolate erano costituite quasi esclusivamente di mesentericus, sottile e radiciforme, di quelle specie cioè, che hanno forme durature, resistenti non poco agli agenti sterilizzanti chimici e fisici.

Non potevo invero essere ancora soddisfatto delle condizioni di esperimento, in cui mi ero messo, poichè non del tutto conformi a quella che di frequente si osserva nella vita domestica. Non in tutti i paesi, non in tutte le contrade si ha a disposizione acqua, che possieda la bontà e la purezza dell'acqua del Serino. Non di rado si vede, in ispecie in campagna, della gente, che, per amore o per forza, deve adoperare, ad uso potabile, un'acqua sotto tutti i punti di vista condannabile dall'igiene, sia per l'apparenza che per la sostanza.

Se di tale acqua si servono ad uso potabile che dire poi per gli altri usi: di quali acque si serviranno per lavare gli erbaggi, che saranno apparentemente puliti, quando saranno liberati dai grani di terriccio e dalle particelle di concime che vi sono attaccate.

Tutto ciò considerato, ho voluto vedere come risponde in queste acque il tachiolo.

Mi son servito allo scopo dell'acqua di una piccola peschiera, che sta nel giardinetto annesso all'Istituto di medicina legale, in questo stesso edificio. È un'acqua di aspetto torbido, per la presenza di una certa quantità di particelle che vi si trovano in sospensione; contiene tanto di sostanze organiche da richiedere gm. 0.194 di ossigeno per la ossidazione.

Quest'acqua adoperai allo stato naturale, senza far precedere la sterilizzazione; essendo però già per sè ricca di germi, ebbi cura d'immettervi un numero minore di pianticelle d'indivia, e ciò per facilitare da un lato l'esperienza e per non venir meno alla legge enunciata dal Gärtner, che cioè, per un microrganismo che debba essere distrutto, occorre sempre una

quantità determinata del disinfettante: ho creduto quindi opportuno, per mantenere la giusta proporzione tra il numero di germi e la quantità del disinfettante adoperato, di sottoporre al lavaggio un numero minore di piantine.

Del resto la tecnica seguita è identica a quella delle esperienze precedenti.

Il risultato dell'esame quantitativo delle colonie sviluppatesi è il seguente:

Matraccio A (immediatamente dopo il lavaggio)	colonie	53,795
» B id.	»	46,830
» B′ (dopo 15′)	»	155
» B″ (dopo 30′)	»	62
» B‴ (dopo 45′)	»	27

Come è facile rilevare dalla evidenza di queste cifre, i risultati sono molto lusinghieri ed incoraggianti; ma ben facilmente mi si potrebbe osservare che c'è ancora nelle esperienze l'artificio del laboratorio e non la traduzione pratica di quello che succede ordinariamente nella vita domestica.

Si sa, infatti, che nel lavare gli erbaggi non si passano semplicemente da un'acqua in un'altra, così come io ho fatto nelle mie esperienze, ma si sottopongono molte volte ad un lavaggio lungo e spesso all'acqua corrente.

In queste condizioni, è naturale, viene a mancare quel numero notevole di batteri che io rilevo ancora nelle piantine, dopo il passaggio dalla prima alla seconda acqua di lavaggio.

Mi son messo perciò in condizioni identiche di esperimento. Ho sottoposto una certa quantità di piantine d'indivia per un quarto d'ora sotto un *filo* d'acqua, e quindi ne ho prelevate sei e le ho messe nella soluzione di tachiolo 1 $^{0}/_{00}$, e due in un matraccio con 50 cmc. di acqua sterile (A). Ad intervalli di 10, 30, 45′ ho prelevato dalla soluzione di tachiolo due delle piantine e le ho lavate in 50 cmc. di acqua sterile; dell'acqua del primo matraccio (A) e degli altri tre (B, B′, B″) ho fatto isolamenti ed ho trovato in ½ cmc. di acqua:

A	colonie	2,360
B (15′)	»	275
B′ (30′)	»	183
B″ (45′)	»	105

Stando a quanto si rileva dalle cifre ottenute nei diversi esperimenti, potrebbe sembrare a prima vista, che ci sia discordanza tra

l'un risultato e l'altro, che l'azione disinfettante non sia uniforme nei diversi casi; potendo avere, come ad esempio nel caso precedente, lo sviluppo di 105 colonie; pur avendo esso agito ben 45', mentre se ne ebbero solo 27 nell'esperienza precedente.

Ma la contraddizione non è che apparente, poichè si capisce facilmente, che gli erbaggi, così come ci vengono dal mercato, non sono mai egualmente puliti dal terriccio e dalle sporcizie, e poi perchè il terreno, in cui essi sono stati coltivati, può essere più o meno ricco di batteri, e contenere un numero vario di specie resistenti all'azione del disinfettante.

Per completare infine questa serie di esperienze ho creduto opportuno passare allo studio del potere disinfettante del tachiolo di fronte a specie determinate di germi e precisamente di germi patogeni, che, introdotti nel tubo gastro-enterico, con gli erbaggi ingeriti crudi, possono essere la causa prima dello sviluppo di una malattia infettiva, ed in secondo tempo di una epidemia.

Nei mercati di Roma è stato trovato ed identificato con tutti i mezzi, di cui la batteriologia dispone, il bacillo del tifo negli erbaggi. Remlinger e Schneider esaminarono 13 campioni di terreno prelevato in diverse località. In 7 di questi campioni isolarono un germe che aveva tutti i caratteri del bacillo di Eberth. E se non è stato trovato (per quanto è a mia conoscenza) il bacillo del colera, è presumibile ch'esso vi si possa accidentalmente riscontrare, essendo già noto che esso molte volte è stato isolato dalle acque (Pasquali, Sanarelli, Roux, Metchnikoff).

Dalle ricerche di Dunham apprendiamo che sulle foglie crude, infettate con cultura in brodo e messe sotto una campana di cristallo alla temperatura dell'ambiente, il colera si mantiene vivo per ben 5 giorni; sui cavoli crudi, a temperatura dell'ambiente, 13 giorni e nel ghiaccio 14 giorni.

Stando alle esperienze di Framboé, tra due foglie di cavolo crudo, esposte all'aria, a temperatura dell'ambiente, vive per tre giorni.

È quindi col bacillo del tifo e col vibrione del colera, che io ho fatto le mie esperienze.

Ho lavato a lungo, per circa quattr'ore, in un colabrodo, un certo numero di piantine d'indivia, che ho quindi immerse in acqua, in cui avevo versato una cultura di 24 ore di tifo, in brodo. Trascorse parecchie ore dall'immersione, delle piantine ben lavate con acqua del Serino, due ne immersi in 50 cmc. di acqua sterile, di cui, previa agitazione, feci culture su piastre, e sei in 100 cmc. d'acqua, a cui aggiunsi 1 cmc. di soluzione madre di tachiolo. Con l'intervallo di 10' due piantine per volta furono prelevate ed immerse in 50 cmc. d'acqua sterile, e di questa quindi, dopo intenso rimescolamento, in modo da staccare dalle piante il maggior numero possibile di batteri che vi erano rimasti aderenti, feci culture in scatole di Petri.

La quantità d'acqua per l'innesto fu $^1/_2$ cmc. ed $^1/_{10}$.

Riassumo nella tabella seguente i risultati:

Dall'acqua di lavaggio originaria:

Con	$^1/_2$ cmc.	. . . . .	numero di colonie	∞
»	$^1/_{10}$ cmc.	. . . . .	id.	4,300

Isolai un certo numero delle colonie sviluppate, per averne delle culture pure e potere identificare la natura dei batteri. Molte di esse erano colonie del b. tifico, come ho potuto constatare con tutti i mezzi culturali che avevo a mia disposizione, ed infine con la prova dell'agglutinamento (reazione di Pfeiffer).

Dall'acqua di lavaggio dei tre matraccetti, in cui avevo passate le piantine dalla soluzione di tachiolo:

A	(dopo 10′)	con	$^1/_2$	cmc.	. . . . .	colonie	192
	Id.	»	$^1/_{10}$	»	. . . . . .	»	15
A′	(dopo 20′)	»	$^1/_2$	»	. . . . . .	»	9
	Id.	»	$^1/_{40}$	»	. . . . . .	»	3
A″	Id.	»	$^1/_2$	»	. . . . . .	»	7
	Id.	»	$^1/_{10}$	»	. . . . . .	»	3

Veruna di queste colonie (attentamente studiate) si dimostrò di b. tifico.

La stessa tecnica ho seguita per esperimentare col vibrione del colera. I risultati sono stati perfettamente identici ai precedenti, e faccio quindi a meno di ripetermi; dall'acqua di lavaggio originaria (chiamo così l'acqua in cui ho immerse le piantine direttamente dal mezzo in cui era sospeso il b. di colera) l'isolamento mostrò un numero straordinariamente grande di colonie, e di queste moltissime di b. di colera, come potei identificare, servendomi di tutti i mezzi di cultura opportuni, e specialmente dell'acqua peptonizzata di Koch.

Gli isolamenti delle acque di lavaggio delle piantine, che erano passate attraverso la soluzione di tachiolo, mi dimostrarono un numero scarso di colonie, costituite tutte da sottile, mesenterico e radiciforme. Veruna era assolutamente colonia di colera.

Non è a dire, che una piccola quantità di tachiolo, per quanto minima, trasportata nell'acqua di lavaggio, e da questa nell'agar, abbia potuto esercitare nel terreno di cultura azione antisettica; poichè, anche ammettendo che 2 cmc. della soluzione di tachiolo (1 per 10,000) sieno potuti passare nei 50 cmc. d'acqua di lavaggio, se si pensa che di questa, solo 1/10 di cmc. ne abbiamo versato in 10 cmc. di agar e di gelatina, si comprende subito come si sia ar-

rivati ad una diluizione talmente elevata, che è giusto di non tener conto della possibile causa di errore. E ciò tanto più, che dalle esperienze di Paladino risulta che il b. del tifo sviluppa in brodo. in presenza del tachiolo fino alla diluizione di 1 : 15,000 e quello del colera alla diluizione di 1 : 50,000.

Nè alcuno, ad escludere dalla pratica questo disinfettante, potrebbe tirare in ballo la tossicità che esso potrebbe spiegare nell'organismo animale: all'obbiezione rispondono le esperienze del Lazzaro e del Perez: il primo lo introdusse nell'organismo umano fino alla dose di 5 mgm. al giorno, senza rimarcare disturbo di sorta; ove mai si obbiettasse, che, come risulta dalle esperienze di Inghilleri. iniettato sotto cute il tachiolo, anche a dosi elevate, non si riscontra nel sangue, nè negli organi parenchimatosi, rimanendo esso localizzato nel sito d'iniezione, si possono citare le esperienze molto concludenti del釘ternò e Cingolani. Essi fecero bere a due cani e per la durata di tre mesi, dell'acqua, a cui era stato aggiunto del tachiolo nel rapporto di 1 : 15,000. I cani sono rimasti sempre bene. aumentando anche di peso. Io ho alimentato con erbaggi immersi in soluzione di tachiolo 1 : 10,000 larga serie di conigli e cavie, tanto sani, quanto già in esperimento: nessun disturbo hanno presentato e per quelli già trattati, l'esperimento è proceduto regolarmente. così come negli animali alimentati con erbaggi allo stato naturale.

Conclusione.

Volendo concludere, io credo, che il tachiolo sia un disinfettante che può esser tenuto presente nel lavaggio delle ortaglie, di quelle in ispecie che vengono adoperate fresche nell'alimentazione, poichè, come si rileva dalle esperienze su esposte, le forme che resistono sono pochissime e in massima parte forme sporigene, che non hanno alcun potere patogeno. Debbo però ricordare che non m'è riuscito di trovare delle ortaglie, che contenessero naturalmente bacilli del carbonchio, nè ebbi cura di prepararmene artificialmente.

La piccola quantità di tachiolo che potrà essere ingerita, non sarà certo, al dire di molti autori, di danno alcuno; ma, ove mai qualche dubbio si avesse in proposito, ben di leggieri potrà essere eliminato. A tutti e dovunque è dato di potersi procurare dell'acqua sterile, sottoponendo all'ebollizione l'acqua di cui si dispone; se. quindi, dopo subìta l'azione del disinfettante, si passano gli erbaggi

in acqua sterile, si potranno avere allo stato naturale, privi del disinfettante chimico e di possibili germi patogeni.

Altro vantaggio che presenta il disinfettante in parola si è l'uso facile, ed il prezzo relativamente poco elevato, data la diluizione a cui dev'essere adoperato.

BIBLIOGRAFIA.

V. Galippe. ***Note sur la présence de microrganismes dans les tissus végétaux.*** **Journal des connaissances médicales. Paris, 1887.**

A. Fernbach. ***De l'absence de microbes dans les tissus végétaux.*** **Annales de l'Institut Pasteur, 1888.**

A. Di Vestea. ***De l'absence de microbes dans les tissus végétaux.*** **Annales de l'Institut Pasteur, 1888.**

F. Biancotti. Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1901.

E. Fazio. ***I microrganismi nei vegetali usati freschi nell'alimentazione.*** **Rivista internazionale d'igiene, 1890.**

Paternò e Cingolani. ***Nuovo processo di disinfezione delle acque potabili.*** **Reale Accademia dei Lincei, 1903.**

F. Inghilleri. ***Sul comportamento del potere disinfettante del tachiolo.*** **Archivio di farmacologia sperimentale e scienze affini, 1902.**

A. Paladino-Blandini. ***Il tachiolo nella depurazione delle acque potabili.*** **Giornale internazionale delle scienze mediche, 1904.**

F. Biancotti. ***Il tachiolo in rapporto all'igiene.*** **Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1904.**

Grancher et Deschamps. Arch. de Phisiol. norm. e path., 1893.

Klauditz. ***Typhus und Pflanzen.*** **Hygienische Rundschau, settembre 1904.**

Ellroth G. ***Ueber das Eindringen von Bakterien in Pflanzen.*** **Centralbl. f. Bakteriol., 1902, Abt. II, Bd. 9.**

Istituto d'Igiene della R. Università di Napoli.

Di alcune alterazioni del sangue nell'infezione carbonchiosa sperimentale

pel dottor **GIOVANNI ORSI.**

L' infezione carbonchiosa ha avuto sempre grande importanza nella batteriologia, di cui, si può dire, ha iniziato gli studii; e sul bacillo che la produce è stata rivolta, per non breve periodo di tempo, l' attenzione di non pochi fra i migliori sperimentatori.

Dalla scoverta del bacillo, intravisto da Rayer, Brauell e Pollender e poi studiato dal Davaine e più tardi dal Pasteur e dal Koch, i batteriologi hanno cercato, seguendo varie vie, di mettere in chiaro la patogenesi di questo morbo purtroppo abbastanza diffuso per porre un argine al male che esso produce con una appropriata profilassi ed una razionale terapia.

Questa infezione, infatti, comune agli uomini ed agli animali (ovini, bovini, equini) è più o meno largamente diffusa tra gli operai addetti ad alcune industrie, di cui costituisce un pericolo serio, e perciò riesce di grave nocumento al benessere degli individui che esercitano alcuni mestieri, non calcolando il dissesto finanziario che d'altra parte produce.

È ben nota la resistenza delle spore del bacillo del carbonchio e la tenacità con cui esse sopravvivono per lungo tempo nelle più sfavorevoli condizioni di vita; i *campi maledetti* di certe contrade hanno dato sul bestiame delle prove veramente dolorose della resistenza del germe e del potere di diffusione di questa malattia.

La forma con cui essa si manifesta è diversa a seconda che si tratta dell' uomo o degli animali: in questi la malattia assume quasi sempre tutti i caratteri di una terribile setticemia che in breve vince i poteri di resistenza organica e produce la morte; nell' uomo invece i sintomi sono diversi a seconda della via di entrata del germe, e si distingue: la *pustola maligna*, se il carbonchio si inocula per lesioni di continuo della cute, come di frequente nei macellai, in persone che hanno contatto col gregge ecc.; la *micosi pulmonale*, o malattia dei cenciaiuoli e dei cardatori di lana, se la via di penetrazione del germe è quella dell'apparato respiratorio; e la *micosi intestinale*, se la via di entrata è costituita dal tubo gastro-enterico.

La forma più frequente però a riscontrarsi, specialmente per la maggiore frequenza della penetrazione del germe per la via cutanea, è quella della pustola maligna che si manifesta con caratteri ben definiti e che poi,

nei casi ribelli, si converte, il più delle volte, in una setticemia analoga a quella che si ha direttamente negli animali e capace di dare la morte all'ammalato.

La tappa finale, perciò, quasi costante del carbonchio è la setticemia; il bacillo che lo produce tende a penetrare nel sangue e poi esplica al massimo grado i suoi poteri deleterii sugli organismi animali, minandone la esistenza e vincendone la resistenza organica.

Nel sangue questo microrganismo avido di ossigeno trova un ambiente adatto alla sua vita; nel sangue raggiunge l'*optimum* della sua esistenza ed in esso si accumula, producendo alcune volte trombosi dei vasi ed esplicando sulla crasi sanguigna la sua azione dissolvitrice ed il suo potere patogeno o con speciali sostanze da esso secrete od anche con il prodotto del proprio disfacimento.

Avendo presente questo modo di comportarsi del bacillo del carbonchio, mi sono proposto di studiare, in modo ordinato, il *decorrere della infezione sperimentale, per quanto riguarda le alterazioni del sangue in rapporto ai varii periodi del morbo;* ed a questo scopo mi sono servito di conigli di cui avevo gia prima esaminato numericamente e morfologicamente il sangue.

Il virus proveniva da una cultura su agar di 24 ore, fatta dal sangue di una cavia morta di carbonchio; emulsiono due anse della patina in 4 cmc. di brodo sterile e ne inietto due sottocute o per via endovenosa, il virus adoperato uccide l'animale dopo tre a cinque giorni e dà perciò il tempo di poter studiare le alterazioni ematiche a grado a grado.

A misura che procedo all'esame del sangue, fatto il più spesso possibile, innesto dei tubi di agar con sangue ottenuto asetticamente dalla vena marginale di un orecchio dello stesso animale inoculato per via sottocutanea e ciò per conoscere il momento della presenza del microrganismo nel sangue.

Per la numerazione dei globuli, eseguita di 24 in 24 ore, uso il contaglobuli di Thoma; per l'esame istologico mi servo di sangue ottenuto con puntura da una vena dell'orecchio, facendone penetrare per capillarità una piccola quantità fra due vetrini copri-oggetti, strisciandoli dolcemente per ottenere uno strato sottile senza alterare i globuli, specialmente i bianchi, ed essicando poi rapidamente all'aria, a moderato calore.

Per la fissazione mi son servito a preferenza del miscuglio di alcool e cloroformio a parti uguali, nel quale ho tenuto immersi i vetrini per un tempo variabile dalle 2 alle 24 ore; e poi, sussidiariamente, come in seguito dirò, della fissazione ottenuta esponendo per breve tempo il sangue ai vapori dell'acido osmico.

I vetrini sono stati colorati in vario modo, ma la colorazione che mi ha dato i migliori risultati e che meglio si è prestata nelle mie ricerche è stata quella doppia con soluzioni acquose di eosina marca *A-B* e di bleu di metilene Grübler, adoperate separatamente.

Per completare lo studio del sangue ho poi eseguiti numerosi preparati

a stampo della midolla ossea, della milza, delle glandule linfatiche e dell'essudato dal punto della inoculazione, nei diversi periodi della infezione.

Prima di procedere però allo studio del sangue di animali infetti, ho determinato in molti conigli la costituzione normale del loro sangue e la struttura degli elementi di esso.

Nel coniglio nuovo i globuli rossi sono in numero di 5-7 milioni per mmc., sono rare le forme di globuli rossi nucleati, ma non così le forme di globuli degenerati.

I globuli bianchi vi si trovano in numero sensibilmente variabile da 6000 a 14000 e con un rapporto ai rossi di 1 : 400 a 1 : 1000. Se ne distinguono di varie forme:

1.° *Linfociti:* di due varietà *grandi* e *piccoli* e col predominio di questi su quelli; hanno la grandezza di un globulo rosso all'incirca, nucleo voluminoso, rotondeggiante, colorabile intensamente col bleu di metilene e protoplasma scarso, disposto ad alone attorno al nucleo e colorabile col bleu in un modo più intenso del nucleo stesso. Se ne trovano in proporzione del 40-55 per cento dei leucociti totali.

2.° *Polinucleari o leucociti a nucleo polimorfo:* hanno un nucleo frastagliato o variamente lobato, intensamente colorabile col bleu di metilene, protoplasma acidofilo e contenente granulazioni che si colorano coi colori acidi e rappresentano le β di Ehrlich, altrimenti dette *pseudo eosinofile*. Essi costituiscono il 45-60 per cento dei leucociti del coniglio.

Le granulazioni eosinofile sono sensibilmente più grosse di quelle dell'uomo, ma gli elementi che le contengono sono molto scarsi. Di *Mastzellen* non ho ritrovato mai alcun esemplare.

3.° Le forme *mononucleari* grandi di Ehrlich che sono anche scarse e si presentano a nucleo grosso, disposto eccentricamente e debolmente colorabile col bleu di metilene ed a protoplasma abbondante, privo di granulazioni e leggermente basofilo.

Determinata così la *costituzione del sangue di coniglio normale*, passo allo studio del sangue carbonchioso ed a tale scopo inoculo molti conigli per via sottocutanea e per via endovenosa.

Riporto nei quadri seguenti i risultati ottenuti con la numerazione dei globuli in alcuni di detti conigli e l'esito delle culture fatte dal sangue degli stessi animali nelle varie ore dopo l'inoculazione.

TABELLA I. — *I conigli A, B, C furono inoculati con carbonchio sotto cute; il coniglio D per via endovenosa.*

Ore trascorse dalla inoculazione	Coniglio A Glob. rossi	Coniglio A Glob. bianchi	Coniglio A %	Coniglio A Rapporto	Coniglio B Glob. rossi	Coniglio B Glob. bianchi	Coniglio B %	Coniglio B Rapporto	Coniglio C Glob. rossi	Coniglio C Glob. bianchi	Coniglio C %	Coniglio C Rapporto	Coniglio D Glob. rossi	Coniglio D Glob. bianchi	Coniglio D %	Coniglio D Rapporto
		l. 6.845	49	..	..	l. 8.750	55	..	..	l. 4.062	42	..	..	l. 4.060	50	..
Sangue normale	7.175.000	14.000	..	1 : 512	7.260.000	15.937	..	1 : 455	7.300.000	9.687	..	1 : 754	6.200.000	8.120	..	1 : 764
		p. 7.155	51	..	..	p. 7.187	45	..	..	p. 5.625	58	..	..	p. 4.060	50	..
		l. 4.687	28	..	..	l. 7.500	55	..	..	l. 5.625	42	..	..	l. 2.500	29	..
A 24 ore . . .	6.530.000	16.562	..	1 : 393	8.460.000	13.750	..	1 : 615	7.500.000	13.437	..	1 : 558	5.300.000	8.750	..	1 : 606
		p. 11.875	72	..	..	p. 6.250	45	..	..	p. 7.812	58	..	..	p. 6.250	71	..
		l. 6.250	16	..	..	l. 9.500	46	..	..	l. 10.625	35	..	..	l. 2.180	21	..
A 48 ore . . .	5.850.000	39.062	..	1 : 150	7.200.000	20.500	..	1 : 351	5 650.000	30.625	..	1 . 184	5.200.000	10.620	..	1 : 490
		p. 32.812	84	..	..	p. 11.000	54	..	.	p. 20 000	65	..	..	p. 8.430	79	..
						l. 14.375	42	..	..	l. 9.062	34	..	..	l. 4 060	17	..
A 72 ore . . .	+	..	..	..	6.300.000	34 375	..	1 : 183	5.600.000	26.875	..	1 : 208	4.800.000	24.060	..	1 : 200
						p. 20.000	58	..	..	p. 17.813	66	..	..	p. 20.000	83	..
A 96 ore . . .	..	..	..	..	+	..	..	..	+	..	..	..	+	..	..	..

l. = linfociti — p. = polinucleati.

TABELLA II. — *Esito delle culture fatte dal sangue.*

Ore trascorse dalla inoculazione	14	19	23	35	40
Coniglio A	—	—	—	+	..
Coniglio B	—	—	—	—	+
Coniglio C	—	—	—	—	+

Come si rileva dalla tabella I, i globuli rossi, a corso inoltrato della infezione, sono in generale diminuiti di numero ed alcune volte abbastanza considerevolmente.

Potendosi questo risultato riferire ad un'azione emolitica del bacillo del carbonchio o di tossine da esso secrete, volli controllare *in vitro*, se le culture di questo bacillo contenessero già formato un principio ad azione emolitica.

A tale scopo adoperai culture di carbonchio in brodo di 10-15 giorni, filtrate attraverso triplice filtro di carta bibula sterilizzato e col filtrato, da cui gli innesti fatti rimanevano sempre sterili, provai direttamente l'azione emolitica in confronto a tubi di controllo.

In tutti i casi ho ottenuto un risultato negativo; questo però non infirma una possibile azione emolitica verificatasi nel sangue degli animali carbonchiosi; ma potrebbeci dire che l'emolisi sia l'effetto o di un enzima secreto dal bacillo in speciali condizioni di vita, quando cioè esso vive nel sangue ed a spese di questo, o di sostanze ad azione emolitica, messe in libertà dal corpo del batterio nel suo disfacimento; e difatti, nei conigli soprasegnati, la diminuzione dei globuli rossi è legata alla penetrazione del bacillo in circolo.

Consideriamo ora le alterazioni numeriche dei globuli bianchi; questi, secondo alcuni autori, diminuirebbero di numero, io invece ho osservato che aumentano considerevolmente e progressivamente, di pari passo col progredire della infezione, fino alla cifra di 30-40 mila, che per lo più si osserva nella tappa finale del morbo.

Questo aumento dei globuli bianchi, però, non è ugualmente sostenuto dalle varie forme di leucociti: di questi, infatti, i linfociti hanno mantenuto il loro numero assoluto costante od hanno subito

leggiero aumento, mentre, facendo astrazione dai grandi mononucleari che non [presentano delle grandi oscillazioni, i polinucleati hanno mostrato un notevolissimo aumento numerico, in modo da elevare la propria percentuale (fino all'84 %) a scapito di quella dei linfociti, sensibilmente diminuita.

Di non minore interesse sono le alterazioni morfologiche del sangue nella infezione carbonchiosa sperimentale.

A misura che il morbo progredisce i globuli rossi si mostrano sempre più pallidi; le forme necrobiotiche e degenerative aumentano notevolmente di numero e si riscontrano facilmente dei microciti e dei macrociti; gli esemplari non molto rari di eritroblasti ci attestano d'altra parte, insieme al reperto dell'aumento considerevole dei polinucleati, una rimarchevole aumentata attività formativa della midolla delle ossa.

Le piastrine anche si mostrano molto numerose e nei preparati se ne possono riscontrare dei veri ammassi, sparsi nei vari punti dei campi visivi.

I linfociti non presentano alterazioni cospicue; di essi però le forme grandi aumentano rispetto alle piccole; i mononucleari di Ehrlich diventano meno rari e le cellule eosinofile non mostrano sensibili alterazioni, se se ne eccettui una maggiore loro frequenza.

Notevoli sono invece le modificazioni dei polimorfo-nucleati a granulazioni pseudo-eosinofile.

Nei preparati, fissati con alcool e cloroformio e colorati con l'eosina e col bleu di metilene, può osservarsi, già dopo 20-24 ore dalla inoculazione di carbonchio sotto cute, prima ancora cioè che il batterio sia penetrato in circolo, il manifestarsi nel protoplasma di speciali piccole granulazioni, molto fini, in numero scarsissimo, sparse qua e là nel protoplasma cellulare e per lo più lontane dal nucleo che del resto si mostra normale, e colorabili nettamente col bleu di metilene; le granulazioni tingibili in rosso in alcuni globuli si conservano ancora, in altri non si colorano più per modo da dare al globulo l'aspetto così detto *ialino*.

Queste fini granulazioni, che in alcuni leucociti appaiono fra le granulazioni in essi normali, mano a mano che l'infezione progredisce, aumentano di numero e di dimensioni e riempiono tutta la massa protoplasmatica dei leucociti come le pseudo-eosinofile prima esistenti; queste scompaiono del tutto ed il nucleo dei leucociti perde in gran parte la sua affinità pel colore basico, restando d'ordinario poco colorato fra i granuli bleu che facilmente spiccano nella sostanza protoplasmatica.

Queste granulazioni, che nei primi periodi della infezione compaiono solo in pochi elementi, ad infezione inoltrata sono le sole che si possono riscontrare in tutti i globuli bianchi a nucleo polimorfo, se se ne eccettui qualche raro esemplare di cellula eosinofila, e costituiscono un vero esponente del progredire della infezione e dell'azione deleteria esplicata dal morbo sulla crasi sanguigna.

I grossi mononucleari in circolo non ne mostrano mai nel loro protoplasma.

Dai preparati fatti dall'edema del punto d'innesto non si rileva che un plasma uniforme e solo qualche raro elemento morfologico del sangue disfatto od in via di disfacimento.

I preparati a stampo della midolla ossea, fatti dopo la morte degli animali, fanno notare, come nel sangue circolante, che le granulazioni dei mielociti e dei globuli bianchi polinucleati sono sostituiti in massima parte, ed in alcuni animali totalmente, da queste nuove granulazioni che occupano abbondantemente il protoplasma cellulare.

La midolla è in piena attività formativa come si nota dalle forme di passaggio dei leucociti e dagli eritroblasti che si trovano in numero straordinariamente grande.

Le cellule spleniche presentano, ma in modo meno marcato, queste stesse alterazioni e nei preparati si riscontrano frequentemente delle cellule giganti (megacariociti).

Gli elementi delle glandole linfatiche non mostrano alterazioni importanti.

Per controllare questo reperto notevole di granulazioni affini pel bleu di metilene ho eseguiti altri preparati di confronto con la fissazione ai vapori osmici che in certi casi riesce di grande giovamento per la identificazione degli elementi ematici.

In questi preparati, però, ho potuto notare con grande sorpresa che queste granulazioni. che negli altri preparati erano le sole a riscontrarsi, non comparivano affatto e che invece i leucociti a nucleo polimorfo conservavano le proprie granulazioni, colorabili con l'eosina, del quale fatto non ho potuto darmi ragione; solamente poteva notarsi che le granulazioni β nei conigli infetti, anzichè colorarsi spiccatamente in rosso col colore acido, tendevano piuttosto al violaceo.

Quale potrebbe essere ora il significato di queste granulazioni?

lazione di batteri non patogeni, ho inoculato per via endovenosa 2 anse di cultura in agar di 24 ore di bacillo sottile, emulsionate in soluzione fisiologica sterilizzata, ed anche in questo caso ho rinvenuto lo stesso reperto, ma i granuli erano poco numerosi e si rinvenivano soltanto per breve periodo di tempo.

Potendosi arguire da quanto ho detto che il reperto di questi granuli, essendo in rapporto con l'alterazione del globulo, si dovesse rinvenire ogni volta che una sostanza penetrata in circolo rendesse la crasi sanguigna poco adatta alla vita del globulo bianco, ho pensato per provarlo sperimentalmente alla inoculazione nel sangue di sostanze solubili ed al tempo stesso lievemente tossiche; ho adoperato perciò il peptone che, inoculato nelle vene o somministrato per altra via che non sia il tubo gastro-enterico, riesce deleterio per l'organismo, e ne ho inoculato delle dosi non molto rilevanti (2-4 gm.) nelle vene dopo averlo disciolto in soluzione fisiologica e dopo avere sterilizzato accuratamente il tutto.

Anche in questo caso, dopo un certo numero di ore, ho potuto notare la comparsa di questi granuli nei polinucleati, in numero scarso però e per un tempo non molto protratto.

Anche per questa conferma sperimentale quindi risulta chiaro che queste granulazioni non possono avere il significato di granulazioni batteriche e che esse sono l'esponente istologico dell'alterazione del globulo bianco e del suo disfacimento, fatto che potrebbe destare un certo interesse se si pensa di quanto valore siano per la difesa dell'organismo le sostanze messe in circolo dalla distruzione di questi elementi a cui oggi si attribuisce tanta importanza nell'economia animale.

Determinate le principali alterazioni del sangue carbonchioso nei conigli, ho voluto anche studiare l'*influenza che potesse avere la inoculazione del siero sul modo di comportarsi del sangue nel decorso della infezione* e perciò ho adoperato del siero Sclavo, da lui stesso gentilmente fornitomi.

La tecnica seguita è stata sempre la stessa; le esperienze sono state fatte sempre con controllo; in un coniglio poi ho iniettato solamente siero per studiare la reazione organica susseguente alla inoculazione.

Espongo nelle tabelle seguenti il risultato ottenuto in alcuni di detti conigli, di cui uno è morto con un certo ritardo sul controllo, avendo avuto solo 5 cmc. di siero per via endovenosa, contemporaneamente alla inoculazione del germe e un altro è sopravvissuto, avendo avuto 20 cmc. di siero, di cui dieci 24 ore prima della inoculazione del batterio e dieci contemporaneamente a questa.

TABELLA III.

Ore trascorse dalla inoculazione	Coniglio E				Coniglio F				Coniglio G			
	Glob. rossi	Glob. bianchi	%	Rapporto	Glob. rossi	Glob. bianchi	%	Rapporto	Glob. rossi	Glob. bianchi	%	Rapporto
		l. 2.187	38	..	..	l. 3.750	52	..	..	l. 4.375	46	..
Sangue normale	6 700.000	5.937	..	1:1.128	7.300.000	7 187	..	1:1.015	5.600.000	9.437	..	1: 594
		p. 3.750	62	..	..	p. 3.437	48	.	..	p. 5.062	54	..
		l. 5.313	39	...	..	l. 4.687	56	..	..	l. 5.000	53	..
A 32 ore	4.550.000	13.750	..	1: 330	6.950.000	8.437	..	1: 823	5.500.000	9.375	..	1: 587
		p. 8 437	61	..	..	p. 3.750	44	..	..	p. 4.375	47	..
		l. 4.600	18	..	..	l. 4.375	38	..	..	l. 5.000	46	..
A 55 ore	4.950.000	25.000	..	1: 198	5.650.000	11 562	..	1: 488	4.450.000	10.937	..	1: 407
		p. 20.400	82	..	..	p. 7.187	62	..	..	p. 5.937	54	..
		l. 4.687	36	..	..	l. 5.313	68	..	...	l. 5.000	47	..
A 79 ore	6.600.000	13.125	..	1: 502	5.550.000	7.813	..	1: 710	2.000 000	10.625	..	1: 188
		p. 8.438	64	..	..	p. 2 500	32	..	..	p. 5.625	53	..
		l. 5.000	47	..	..	l. 2.500	40	..	..	..	..	..
A 120 ore	6.800.000	10.625	..	1: 640	4 850.000	6.250	..	1: 776	+	..	..	..
		p. 5.625	53	..	..	p. 3.750	60	..	..	..	..	..
A 200 ore	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	..	..

l. = linfociti — p. = polinucleati.

Il coniglio E fu inocultato con 20 cmc. di siero anticarbonchioso per via endovenosa. — Il coniglio F fu inoculato con 5 cmc. di siero per via endovenosa e con carbonchio sotto cute contemporaneamente. — Il coniglio G (controllo) fu inoculato con carbonchio sotto cute.

Tabella IV.

Ore trascorse dalla inoculazione del siero e del batterio	Coniglio H				Ore trascorse dalla inoculazione del batterio	Coniglio I			
	Glob. rossi	Glob. bianchi	%	Rapporto		Glub. rossi	Glob. bianchi	%	Rapporto
Sangue normale......	7. 250. 000	l. 2. 812 6. 250 p. 3. 438	45 .. 55	1 : 1. 705	Sangue normale....	6. 650. 000	l. 3. 750 6. 562 p. 2. 812	57 .. 43	1 : 1. 013
A 24 ore dal siero ...	7. 450. 000	l. 4. 062 7. 500 p. 3. 438	54 .. 46	1 : 993	A 24 ore.......	6. 150. 000	l. 6. 562 11. 250 p. 4. 688	58 .. 42	1 : 546
A 24 ore dal batterio ..	6. 550. 000	l. 4. 062 7. 187 p. 3. 125	57 .. 43	1 : 910	A 48 ore.......	5. 600. 000	l. 7 500 30. 000 p. 22. 500	25 .. 75	1 : 180
A 48 ore dal batterio ..	4. 200. 000	l. 4. 687 7. 500 p. 2. 813	62 .. 38	1 : 560	A 72 ore.......	+	..	..	..
A 72 ore dal batterio ..	6. 800. 000	l. 4. 080 7. 813 p. 3. 733	52 .. 48	1 : 870					
A 96 ore dal batterio ..	7. 200. 000 sopravvive	l. 3. 812 7. 860 p. 4. 058	48 .. 52	1 : 916					

l. = linfociti — p. = polinucleati.

Il coniglio H fu inoculato con 20 cmc. di siero per via endovenosa; con 10 un giorno prima della inoculazione del germe e con 10 contemporaneamente ad essa. — Il coniglio I (controllo) fu inoculato con carbonchio sotto cute.

TABELLA V. — *Esito delle culture fatte dal sangue.*

Ore trascorse dalla inoculazione	8	35	48	55	59	72	80	96	106	120	144
Coniglio F.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	..
Coniglio G.	—	—	—	+	..	..	..	..	..	..	..
Coniglio H.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Coniglio I.	—	—	+	..	..	..	—	..	—	..	..

Come si rileva dalle tabelle il coniglio che ha ricevuto solamente 20 cmc. di siero anticarbonchioso nelle vene ha avuto nei primi due giorni susseguenti alla inoculazione un notevole abbassamento numerico dei globuli rossi ed un aumento dei globuli bianchi, specialmente polinucleati, però, dopo, subito si è ristabilito l'equilibrio fisiologico ed il sangue è rientrato nella sua costituzione normale. Probabilmente le oscillazioni numeriche potrebbero essere attribuite alla inoculazione di siero eterogeneo.

Il controllo invece ha avuto notevolissima ipoglobulia, ma leucocitosi non molto cospicua; all'esame si sono riscontrate le stesse alterazioni morfologiche di cui ho già a lungo discusso.

Nei conigli invece trattati con siero e carbonchio si è avuto nell'uno la morte due giorni dopo il controllo, con progressiva diminuzione dei globuli rossi e con poche variazioni numeriche dei globuli bianchi; nell'altro soltanto lieve oscillazione dei globuli rossi.

L'esame dei globuli bianchi a granulazioni β nel coniglio trattato solo col siero ed in quelli trattati col siero insieme al germe ha mostrato questo di caratteristico: nelle prime 48 ore ed in quelli col solo siero più a lungo, mentre già nel controllo erano comparse le granulazioni tingibili col bleu, i leucociti polinucleati di questi conigli hanno assunto una colorabilità spiccata con l'eosina tanto da aver quasi l'aspetto di cellule eosinofile del sangue umano.

La grossezza delle granulazioni, la loro colorabilità brillante con l'eosina, la forma, il numero, la disposizione speciale attorno al nucleo, la scarsezza del citoplasma nel globulo, sono i fattori che le fanno apparire come le eosinofile dell'uomo, e, se non si confondono con esse, è perchè si ritrovano in tutti i polinucleati del sangue dei conigli così trattati.

È questo un fatto importante perchè ci dinota come queste granulazioni sieno sensibili alla iniezione di siero e come si possono in dati casi avere delle vere forme di passaggio fra le varie specie di granulazioni dei polinucleati.

Però nel coniglio in cui l'infezione non ha tardato a prendere il sopravvento, si è potuto osservare molto chiaramente il comparire delle granulazioni affini pel bleu di metilene, fra quelle che si coloravano brillantemente con l'eosina; sono stati questi i preparati migliori e più dimostrativi che mi hanno fatto seguire le modificazioni nella colorabilità delle granulazioni già esistenti nel globulo.

Nel coniglio sopravvissuto non si sono notate mai le granulazioni affini per il bleu di metilene nell'interno dei polinucleati.

In riguardo poi alla presenza del germe nel sangue; in uno dei conigli trattati con siero esso si è rinvenuto dopo circa 120 ore dalla inoculazione, mentre nel controllo era già constatabile dopo 55 ore; nell'altro le culture sono state sempre negative.

Da queste esperienze eseguite col siero si è potuto rilevare dunque come nei conigli sopravissuti non si hanno le alterazioni del sangue e la presenza delle granulazioni affini pel bleu di metilene, così come si riscontrano in tutti i conigli che soccombono all'infezione; inoltre in essi il quantitativo assoluto dei globuli bianchi non ha mostrato oscillazioni notevoli ed è naturale se si pensi che, mancando una distruzione notevole di questi elementi, ne è mancata anche una vera iperproduzione.

Le più rigorose conclusioni permesse da quanto ho esposto sarebbero:

1° che il bacillo del carbonchio, inoculato sotto cute ai conigli, può constatarsi nel sangue circa 40-50 ore dopo l'inoculazione, e esplica la sua azione sulla crasi sanguigna o con speciale enzima da esso secreto, o meglio con il prodotto del proprio disfacimento, producendo diminuzione dei globuli rossi e aumento notevole dei globuli bianchi, specialmente polinucleati;

2° che i leucociti per l'azione di queste sostanze si alterano profondamente e nel protoplasma dei polinucleati compaiono delle granulazioni che si colorano col bleu di metilene dopo la fissazione del sangue in alcool e cloroformio e non dopo quella all'acido osmico. Queste granulazioni, che non resistono alla colorazione col metodo di Gram, probabilmente rappresentano il risultato di alterazioni delle granulazioni pseudo-eosinofile già esistenti nei leucociti e sono l'indice delle alterazioni cellulari;

3° che nella midolla ossea, come nel sangue circolante e in

parte nella milza, al termine dell'infezione, queste granulazioni sostituiscono, ed in alcuni casi totalmente, le granulazioni β;

4° che queste granulazioni incominciano a manifestarsi prima che il bacillo passi nel sangue e aumentano col progredire dell'infezione. Esse, d'altra parte, non sono specifiche del carbonchio, ma si rinvengono anche in altre infezioni (stafilococco, streptococco, ecc.), dopo inoculazioni di corpi batterici uccisi col calore (stafilococco, tifo), ed in scarsissima quantità dopo inoculazione endovenosa di batteri non patogeni (b. sottile) come dopo l'introduzione in circolo di sostanze tossiche (peptone).

Da esse nell'infezione carbonchiosa sperimentale, si può avere, almeno fino ad un certo punto, un indizio sul progredire del morbo e come un giudizio prognostico;

5° che nei conigli trattati col siero è ritardato o impedito il passaggio in circolo del batterio, ed in primo tempo le granulazioni normali si rendono più brillantemente colorabili ed acquistano i caratteri veri e propri delle eosinofile dell'uomo.

Nei conigli che sopravivono non si nota la presenza di granulazioni affini pel bleu di metilene.

6° che il siero da solo produce per qualche giorno ipoglobulia ed oscillazioni numeriche dei leucociti, ma poi il sangue non tarda a rientrare nelle condizioni normali.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI NAPOLI

Due casi di ulcera corneale da "streptothrix,,

per i

Professore D. DE BERNARDINIS Dott. A. DI DONNA (1), assistente.

(Con le Tav. VIII e IX).

Lo studio sperimentale fatto da uno di noi (2) con una speciale forma di *streptothrix* patogena, identificata e studiata in questo Istituto, sulla cornea dei conigli, gli fece rivolgere la sua attenzione sulla possibilità che alle *streptothrix* spettasse una speciale importanza etiologica nella genesi di ulceri corneali. E ciò più specialmente, se si tien conto da un lato dell'accertata grande diffusione delle *streptothrix* nel terreno, nell'aria, nelle polveri dei cereali e così via dicendo, dall'altro canto della frequenza abbastanza notevole di quella affezione oculare.

Dopo numerose osservazioni di ulceri corneali, presentatesi alla clinica oculistica della R. Università, si è in grado di riferire due casi di cheratite ulcerosa da *streptothrix*, di cui una seguìta da panoftalmite, meritevoli di considerazione, non solo per la loro completezza, avendo una di esse, oltre al fondamento clinico, batteriologico e sperimentale, anche il controllo anatomico, che in osservazioni simili ha sempre un grande valore, ma altresì perchè con esse vien messa fuori dubbio una genesi finora non conosciuta dell'ulcera corneale con ipopion.

OSSERVAZIONE I. — T... D.... fu Giovanni, da Roccaravinola, di anni 65, si presentò all'ambulatorio della clinica oculistica il 13 luglio 1960, accusando una grave malattia dell'O. D.

---

(1) Del presente lavoro al prof. De Berardinis spetta la parte clinica ed anatomica, al dott. Di Donna la parte batteriologica.
(2) V. questi Annali, anno 1904.

Ella raccontò che pochi giorni innanzi fu colpita all'O.D. da una festuca di grano, che le produsse grande dolore.

L'indomani notò una piccola macchia biancastra sulla cornea, che andò man mano aumentando in estensione, e, quasi contemporaneamente, di pari passo arrossimento del bulbo, secrezione muco-purulenta e dolori intensi, fatti che hanno costretto l'inferma a chiedere l'aiuto dell'oculista.

All'epoca dell'attuale osservazione presentava: O. D. intensa iniezione delle congiuntive tarsee con superficie lievemente irregolare, forte iniezione pericheratica, cornea mostrante nel suo centro una perdita di sostanza rotondeggiante, piuttosto superficiale, di colorito biancastro, che occupava più del disco corneale pupillare a margini infiltrati e sottominati. Il resto della cornea era abbastanza trasparente, e lasciava notare evidente ipopion raccolto nel fondo della camera anteriore; l'iride era fosca, la pupilla dilatata, la Tn. e la V. ridotta ai movimenti della mano.

Premendo sulla regione del sacco non fuoriusciva nulla dei punti lacrimali.

Dinanzi ad un'affezione ulcerosa era innanzi tutto necessario arrestarne il corso, che spesso suol essere fatale. Lavato ben bene l'occhio con acqua distillata sterile, furono eseguiti numerosi innesti sui vari terreni di coltura, brodo, agar, siero e dei preparati colorati, conficcando l'ago al di sotto dei margini sottominati.

Subito dopo si praticarono ripetute lavande con soluzione di sublimato all'1 su 5 mila, furono causticati con l'ansa galvanica il fondo ed i margini infiltrati dell'ulcera e sopra venne spolverato dello xeroformio.

14 luglio. L'ulcera era alquanto detersa, in ispecie nel fondo; rimanevano infiltrati in due punti, esterno ed interno, i soli margini, ma molto meno accentuati del giorno precedente; l'ipopion era un po' diminuito, la pupilla alquanto dilatata, la Tn.

15. Gli stessi fatti accentuati.

16. L'ulcera era alqnanto detersa, rimanevano però i due punti d'infiltrazione, specie all'interno, dove il margine appariva un po' più sottominato, persisteva ancora l'ipopion, la T lievemente aumentata; si istillò pilocarpina.

17. Persistendo l'infiltrazione e l'aumento di tensione, fu praticata una paracentesi in basso, vuotando così l'ipopion dalla camera anteriore.

Dai punti infiltrati vennero ripetuti gli innesti culturali.

18. Dal giorno 18 l'ulcera si avviò alla guarigione, essendo scomparsa ogni traccia d'infiltrazione e d'ipopion e la T scesa al normale.

In seguito, man mano, la perdita di sostanza si andò riparando fino a completa guarigione, residuando un leucoma centrale non molto esteso.

Caratteri morfologici e culturali della streptothrix *riscontrata.* — Dopo 24 ore a 37° C. si ebbe nelle colture di isolamento lo sviluppo di piccole colonie superficiali, che non oltrepassarono la grandezza di 1 1/2 mm., poco sollevate sulla superficie e poco consistenti, a margini regolari, di colorito manifestamente giallo, le quali, viste al microscopio, a piccolo ingrandimento, apparivano di colorito grigiastro-opaco, granulose, a grossi granuli al centro, e appena trasparenti al margine; le colonie profonde, che crebbero assai poco, erano brunicce, granulose, alquanto regolari nei contorni.

Nella gelatina crebbero ancora meglio, quantunque più lentamente e in 4-3 giorni fusero limitatamente il terreno di nutrizione.

Brodo di carne. — In 24 ore, alla temperatura di 37° C., si ebbe uno sviluppo molto abbondante con intorbidamento e deposito fioccoso al fondo della provetta.

Agar peptonizzato a reazione alcalina. Accrescimento con produzione di pigmento giallo-arancio.

Gelatina, per infissione. — La fusione, iniziatasi al centro, si estende ai margini piuttosto rapidamente, quindi procede a strati. Si ha pure produzione di pigmento, ma poco.

Brodo con glucosio all' 1 %. — Sviluppo ad ammassi fioccosi, senza intorbidamento del mezzo.

Nel *siero* di sangue di coniglio, liquido e solidificato. — Crebbe discretamente.

Gli innesti sulla patata ed in altri mezzi nutritivi fecero rilevare un accrescimento assai scarso o nullo, come nelle culture anaerobiche.

All'esame microscopico delle colture, e più specialmente di quelle in brodo si riscontrarono ammassi ad intreccio di catene di un diplococco, che morfologicamente si rassomigliava ad un altro da noi già studiato e descritto in questi Annali, quale forma di una *streptothrix*.

In base delle conoscenze acquistate credemmo necessario prolungare le nostre osservazioni, malgrado fra i due microrganismi vi fossero delle rimarchevoli differenze, poichè quest'ultimo non diede mai luogo a sviluppo di cattivo odore nelle colture in brodo, nè si dimostrò patogèno pel coniglio, nè per altri animali.

Attecchì, invece, sulla cornea, come sarà innanzi dimostrato.

Dopo alcuni mesi di vita sull'agar, che veniva rinnovato spesso, si potè notare che il germe aveva perduto il potere di produrre pigmento, malgrado la costituzione del terreno fosse rimasta la medesima; che la consistenza delle colonie era alquanto cresciuta, e che i singoli elementi della catena avevano l'aspetto piuttosto di bacilli, presentando dei rigonfiamenti a clava (v. fig. IV). Viste al microscopio le singole colonie apparivano adesso brunicce ed opache.

Fu così che successivamente, coltivando il microrganismo nel brodo, si ebbe lo sviluppo di forme bacillari piccole, alcune evidentemente ramificate, ovvero disposte a piccoli mucchi, insieme a catene piuttosto brevi, che toglievano nell'insieme ogni dubbio sulla vera natura del germe (v. fig. VI). Debbo far notare che col volgere del tempo perdette la proprietà di fondere la gelatina, e che dopo vari mesi cessò ogni sviluppo nei terreni artificiali.

Esame sperimentale sull'occhio. — Ogni tentativo d'inoculazione nel sacco congiuntivale ad epitelio integro, riuscì infruttuoso, mentre si ebbe sempre una lieve iniezione, tanto della congiuntiva palpebrale che bulbare, tutte le volte che l'inoculazione fu preceduta da scalfiture.

L'innesto sulla cornea riuscì sempre positivo, a diverso grado però, in rapporto al modo d'inoculazione (puntura, saccoccia, iniezione a mezzo della siringa di Pravatz).

Dopo 24 o 36 ore dall'innesto per puntura si notò costantemente secrezione muco-purulenta, iniezione della congiuntiva palpebrale e bulbare, specialmente in vicinanza del punto d'innesto, e sulla cornea la comparsa di uno o più punti d'infiltrazione biancastra, con un alone circostante più

o meno esteso di colorito grigiastro. Questi fatti aumentarono per uno o due giorni, con la contemporanea comparsa di ipopion nella camera anteriore. Dopo pochi giorni di uno stato stazionario, cominciò il periodo di detersione e poi di riparazione, che in breve tempo divenne completo, residuando un piccolo leucoma.

In genere questo è l'andamento dell'ulcera corneale da *streptothrix*, isolata da T., che può dirsi molto benigna e corrispondente quasi completamente all'ulcera osservata sulla cornea umana. Però, inoculando a mezzo della siringa di Pravatz una piccola quantità di coltura in brodo fra le lamelle corneali, i fatti congiuntivali erano molto più accentuati: notevole l'iniezione bulbare, e l'infiltrazione corneale era più considerevole ed imponente al segno da prendere molte volte buona parte della cornea con abbondante ipopion e con conseguenza rara in perforazione.

Anche l'inoculazione fatta direttamente da un coniglio all'altro col materiale dell'ulcera, riprodusse l'ulcera corneale nei suoi minimi particolari.

In complesso si può dire, che quasi mai, nei numerosi innesti praticati sui conigli e sui cani, si vide riprodotta una grave forma di cheratite ulcerosa.

È caratteristica invece la delimitazione del processo ulcerativo, che potrebbe quasi riguardarsi come un criterio differenziale per la distinzione da ulceri corneali prodotte da altri microrganismi.

Esame anatomico. — Esaminando una sezione di cornea ulcerata notiamo alterazioni varie secondo lo stadio in cui si trova il processo ulcerativo.

La figura I (tav. 2ª), ritrae una sezione di ulcera corneale incipiente a margini infiltrati e sottominati, mentre le lamelle corneali circostanti sono divaricate e racchiudono lacune ripiene di un liquido chiaramente fibrinoso, con scarsi elementi d'infiltrazione.

La figura IV ritrae una sezione di cornea molto più estesamente infiltrata da interessare principalmente gli strati profondi, con interruzione della descenet e dell'endotelio posteriore.

L'ipopion esiste quasi sempre nel fondo della camera anteriore, variamente abbondante, ed è costituito quasi esclusivamente di essudata fibrinoso con pochi elementi d'infiltrazione.

L'iride si mostra infiltrata, i suoi vasi sono dilatati ed il pigmento disfatto.

La ricerca dei microrganismi è stata sempre positiva, e se ne riscontra un gran numero non solo fra gli elementi d'infiltrazione e lamelle corneali sane, ma anche negli spazi esistenti tra lamelle relativamente integre, dove sono evidentissimi e formano delle vere colonie.

Osservazione II. — De M. P..... di R....., di anni 4, si presentò alla Clinica oftalmica di Napoli, il 5 settembre 1903 per essere curato di una affezione all'OS.

I genitori, contadini di Ancri, raccontarono che il loro figliuolo il giorno avanti si era colpito con la punta di un ferro d'ombrello in corrispondenza dell'OS.

All'accidente seguì tosto arrossimento del bulbo, diminuzione rapida della vista, e più tardi secrezione muco-purulenta con dolori più o meno intensi.

All'epoca dell'osservazione si notava: arrossimento e lieve tumefazione delle palpebre; congiuntiva palpebrale e bulbare fortemente arrossita; cornea abbastanza trasparente, che presentava solo nel suo centro una ferita a margini irregolari e di colorito biancastro con ernia dell'iride; camera anteriore, quasi scomparsa, lasciava notare discreta quantità di sangue, che mascherava completamente l'iride. Le escussioni bulbari erano integre, la T diminuita e la V. indistinta. Nulla da parte delle vie lacrimali.

Quantunque la lesione fosse abbastanza grave, non sembrò impossibile sulle prime il poterle circoscrivere alla sola cornea, epperò fu posta ogni cura ad arrestare l'andamento del male.

Prima di iniziare il trattamento curativo, dopo aver lavato ben bene il sacco congiuntivale con soluzione fisiologica sterile, furono eseguiti gl'innesti, nei mezzi di nutrizione artificiali, introducendo l'ago di folatino fra le labbra della ferita corneale. Indi, a mezzo di un piccolo batuffolo di cotone idrofilo, inzuppato in una soluzione di formalina al 4%, si disinfettò ben bene la ferita e si lavò abbondantemente, con soluzione di sublimato 1 su 5 mila, il bulbo, e si bendò.

6 settembre. — Nessuna novità, anzi piuttosto limitata la secrezione congiuntivale, non aumentata l'iniezione bulbare, nessuna traccia di chemosi.

In queste condizioni l'infermo rimase sino al giorno 11 settembre, facendo concepire la speranza di poter almeno conservare il bulbo.

Il giorno 12, invece, si presentò alla osservazione in gravi condizioni: le palpebre, in ispecie la superiore, notevolmente tumefatte, chemosi della congiuntiva bulbare, T fortemente aumentata, escursioni bulbari limitate, intensi dolori al bulbo e sopracciglio, V. spenta.

Con questi fatti faceva contrasto lo stato della cornea, la quale non mostrava alcuna modificazione e la stessa ferita era abbastanza detersa.

Dall'andamento del male ormai era ben evidente lo sviluppo di una grave panoftalmite; epperò, a fine di liberare il piccolo infermo da sofferenze atroci si praticò l'*exenteratio bulbi.* Il contenuto raccolto in recipiente di vetro sterile, servì per ripetere le ricerche batterioscopiche e per l'esame anatomico.

L'infermo guarì in pochi giorni e andò via.

Caratteri morfologici e culturali del microrganismo trovato. — Questa volta, nelle colture piatte, seminate col materiale tolto dall'ulcera corneale, si ebbe lo sviluppo quasi esclusivo di colonie, che crebbero rapidissimamente tanto sull'agar che nella gelatina, oltre ad alcune colonie di un cocco comune privo di potere patogeno.

Le colonie in superficie ben presto confluivano, sicchè sovente accadeva di trovare quasi tutta la piastra, in meno di 24 ore, coperta da una patina di aspetto alquanto iridescente. Ogni singola colonia presentava margini regolari ed era poco rilevata sulla superficie, di consistenza filante, e al microscopio appariva molto finamente granulosa, grigiastra al centro ed a margini trasparenti. L'agar dopo alcuni giorni assumeva una tinta brunastra.

In brodo l'accrescimento era rigoglioso, si aveva intorbidamento, e con l'invecchiamento il mezzo diventava bruno, con formazione alla superficie di piccole scagliette; la consistenza era uguale a quella della coltura su agar.

Brodo con glucosio all'1%, sviluppo assai scarso.

Gelatina per infissione, veniva molto rapidamente fusa, e, dopo alcuni giorni, mentre la fusione procedeva negli strati inferiori, alla superficie si

aveva la comparsa di una bella *colorazione rosso-viva*, che successivamente si estendeva a tutta la coltura; invecchiando, la gelatina diventava rosso-mattone.

Patata. Si ebbe in 48 ore a temperatura di 25-26° C. ed, in tempo più breve, a 37° C. la formazione di una coltura rigogliosa, rilevata sulla superficie, a margini ondulati e di un bel colorito rosso, come nella gelatina.

La produzione di pigmento andò perduta col tempo, solo rimanendo un colorito rosso-ruggine.

Il microrganismo crebbe bene in tutti i mezzi di coltura, però merita di essere specialmente ricordato, che, mentre nell'uovo crudo crebbe alquanto scarsamente, sul bianco d'uovo cotto, si sviluppò assai bene modificando la sostanza nutritiva con produzione di cattivo odore, che mancò in tutti gli altri mezzi. Il siero di sangue solidificato veniva rapidamente fluidificato.

Latte veniva coagulato.

Il siero di sangue di cavallo si dimostrò molto adatto all'accrescimento del germe, poichè ivi diede luogo alla formazione di filamenti ramificati, caratteristici delle streptotricee, quali sono riportati nella fig. I.

Non si constatò mai la produzione di indolo nelle culture.

Esame microscopico. — Nelle prime colture in brodo e in agar si ottenne lo sviluppo di un diplococco, riprodotto nella Fig. V coi caratteri innanzi descritti.

Nelle colture in gelatina alquanto invecchiate il germe appariva sotto forma bacillare e di filamenti di varia lunghezza, talvolta alquanto curvi, con rigonfiamento centrale o ad una estremità, (v. Fig. II e III).

Tali filamenti non mostrarono mai una dicotomia vera. Riportati nel brodo riproducevano la forma cocco-bacillare, che nell'organismo dell'animale assumeva caratteri precisi di diplococco. Sull'agar, invece, prendeva piuttosto l'aspetto di un piccolo bacillo ad estremi arrotondati. Così del pari sulla patata, dove formava una pellicola asciutta, filante, che riusciva difficile di asportare con la punta dell'ago di platino.

Consecutivamente, per graduali passaggi, il germe assunse forma più di bacillo, potendo solo in condizioni anaerobiche, nelle quali si sviluppava scarsamente, crescere come piccolo bacillo, molto simile ad un cocco. Allo stesso scopo si giungeva con passaggi molto frequenti attraverso il corpo dei conigli. Fu così che, dopo una lunga serie di tentativi, si potè giungere a trovare nel siero di sangue di cavallo il terreno adatto alla produzione di manifestazioni caratteristiche della specie, ossia di lunghi filamenti presentanti talora dei rigonfiamenti sul loro decorso, con ramificazioni vere, insieme alle forme bacillari, che ivi si mostrano più allungate.

Colorazione. — Si colorava assai bene con la soluzione acquosa semplice di viola di genziana, e non resisteva al metodo di Gram.

Virulenza. — Si dimostrò virulentissimo pei conigli, nei quali per inoculazione endopleurica produceva rapidamente la morte in 24 ore circa, con assai piccole quantità di coltura in brodo. Anche con colture vecchie si potette uccidere il coniglio, mercè l'inoculazione di 2-3 cmc. di coltura. In tali casi, però, la morte sopravveniva dopo alcuni giorni.

Le inoculazioni sottocutanee di colture poco virulenti, producevano intensa cachessia, con infiltrazioni ed ulcerazioni locali, ma non sempre gli animali morivano.

Le iniezioni endopleuriche di colture virulenti davano luogo ad un versamento siero-ematico (purulento, se con colture invecchiate) e pulmonite acuta in ambedue i lati, il cuore destro era ripieno di un coagulo; l'addome rigonfio, forte replezione sanguigna nel fegato; milza ingrandita ed iperemica, rene fortemente iperemico, specialmente nella sostanza corticale.

Nel sangue si riscontravano germi assai rari.

Le cavie resistevano a grandi dosi di coltura, però morivano tardivamente, dopo 8-10 giorni, con lenta cachessia, senza speciale localizzazione della infezione.

Il filtrato delle colture era privo di tossicità.

Esame anatomico. — L'esame di una sezione di cornea umana mostra di anormale solo un certo rigonfiamento e divaricamento delle lamelle corneali, con formazione di spazii quasi del tutto vuoti e lieve infiltrazione di elementi rotondeggianti, specie alla periferia. La bowmann è ben conservata, così pure l'epitelio anteriore non mostra alterazioni diverse da quelle che sogliono aversi per le ordinarie manipolazioni. Anche la descemet è da per tutto intatta, tranne nel puuto ove la cornea è interrotta in tutta la sua spessezza. Quivi gli estremi più profondi mostrano un aspetto differente, perchè le lamelle corneali sono disgregate, fortemente infiltrate e disseminate di batteri ben visibili mediante le comuni colorazioni. Batteri in gran numero si trovano pure alla periferia della sezione corneale, ed abbondantissimi sulla faccia posteriore della cornea e della camera anteriore, ove sono ammucchiati in veri ammassi sia isolati, sia misti all'essudato purulento. L'iride è irriconoscibile e trasformata in una massa purulenta insieme al corpo ciliare, coroidea e vitreo, disseminati tutti da miriade di batterii.

Indagine sperimentale. — Prima che il germe venisse identificato nei suoi caratteri particolari, vennero subito iniziati esperimenti sull'occhio.

Inoculando una piccola quantttà di coltura sulla congiuntiva ad epitelio integro non si aveva alcuna reazione, previa scalfittura si notava un arrossimento della congiuntiva con scarsa reazione.

Sulla cornea invece l'effetto era più o meno intenso, secondo il modo d'innesto. La semplice puntura dell'epitelio corneale e l'immissione della coltura nel sacco congiuntivale dava luogo, dopo 24-36 ore, a fatti reattivi ben manifesti: ossia arrossimento e tumefazione delle palpebre, secrezione muco-purulenta, che fuoriusciva abbondantemente dalla rima palpebrale e bulbare e comparsa sulla cornea di uno o più punti d'intorbidamento circoscritto, di colorito biancastro ed alquanto rigonfiato sulla superficie. Dopo 2-3 giorni l'intorbidamento acquistava maggiore estensione, mentre la parte centrale s'infossava a scodella e diventava ben manifesto l'alone d'intorbidamento grigiastro, che accompagna quasi tutte le infiltrazioni di una certa entità, e nel fondo della camera anteriore si notava ben presto la comparsa di ipopion più o meno abbondante. Salvo modalità l'ulcera corneale provocata mediante punture semplici dell'epitelio corneale non acquista mai proporzioni molto estese, e dopo 8 a 10 giorni al massimo, si arresta, comincia a diventare grigiastra, l'ipopion si riassorbe e la perdita di sostanza ben presto si ripara residuando un leucoma, ordinariamente poco esteso.

Non si può dire altrettanto qualora l'innesto veniva praticato previa larga ferita sulla cornea o mediante la siringa di Pravatz ad ago sottilissimo.

Allora l'andamento era più tumultuoso ed in meno di 24-48 ore alla secrezione abbondantissima muco-purulenta, alla forte iniezione bulbare si accompagnava infiltrazione rapida di larga estensione della cornea, con perdita di sostanza, che si estendeva in superficie e profondità fino alla perforazione. Nella camera anteriore, intanto, dopo 24 ore, si notava raccolta di abbondante ipopion e l'iride diveniva presto tumida ed increspata.

Questo andamento tumultuoso aveva la durata di una settimana e mezzo a due, cui succedeva un periodo stazionario, e, più tardi, man mano il periodo di eliminazione e riparazione con un leucoma più o meno esteso con impegno o non dell'iride.

Il medesimo andamento più o meno grave mostrava l'ulcera provocata direttamente innestando o il batterio ricavato dall'ulcera sperimentale od anche il secreto purulento dell'ulcera medesima.

Tali erano gli stadi principali dell'ulcera corneale sperimentale provocata dal microrganismo subito dopo isolato dall'infermo de M. Però riprodurre l'ulcera corneale nelle sue varie modalità, anche con una vecchia coltura di vari mesi.

A completamento dell'osservazione clinica e batteriologica fu praticato anche l'esame anatomico di parecchie cornee, nelle quali si produssero ulceri corneali sperimentali.

Le alterazioni erano varie a seconda del diverso stadio dell'ulcera.

Nei gradi incipienti, ossia dopo 24 ore dall'innesto, si notò interruzione o non dell'epitelio corneale e della bowmann ed infiltrazione circoscritta delle lamelle corneali per maggiore o minore estensione (Fig. II). Il rimanente del tessuto corneale era relativamente sano.

Nei casi più gravi ed avanzati le alterazioni erano ben più apprezzabili, perocchè oltre alla mancanza dell'epitelio e della bowmann, parte dello stroma corneale era distrutto e sostituito da ammassi d'infiltrazione (Fig. V). Qua e là si veggono tracce delle lamelle sbrandellate e mascherate dalla infiltrazione. Qualche volta l'ulcera interessava quasi tutta la spessezza della cornea con interruzione della descenet e del suo endotelio.

Il tessuto corneale circostante e sottostante all'ulcerazione mostrava sempre la caratteristica rilevata altre volte: divaricamento delle lamelle corneali, formazione di lacune varie per forma e per grandezza ripiene di tessuto fibrinoso e di pochi elementi d'infiltrazione. Nella camera anteriore si notava sempre abbondante essudato quasi esclusivamente fibrinoso (Fig. V). Essudato si trovava anche sulla faccia anteriore dell'iride, la quale mostrava discreta infiltrazione, dilatazione vasale con disgregamento del suo pigmento.

Per la ricerca dei batteri furono impiegati i comuni colori di anilina. violetto di genziana, fuxina, bleu di metilene, tionina.

Nelle ulcerazioni superficiali e circoscritte i batteri si riscontravano nel mezzo dell'infiltrazione e specialmente nel limite tra infiltrazione e tessuto sano. In quelle invece molto progredite i batteri, oltrecchè in mezzo all'infiltrazione, si trovavano ammucchiati negli spazi interlamellari circostanti e sottostanti all'infiltrazione in quantità tali da formare delle vere colonie.

Riassumendo quanto sopra brevemente si è esposto pare di poter conchiudere di aver descritto due osservazioni, di cheratite

ulcerosa, tutti e due di origine traumatica, ma con andamento diverso, poichè in una si rispecchiano tutti i caratteri dell'ulcera corneale con ipopion seguita da guarigione, mediante leucoma semplice, per quanto abbastanza esteso; nell'altra, invece, oltre alla cheratite ulcerosa si è avuto a constatare un esito triste, ma raro, ossia diffusione alle membrane interne.

In tutto ripetono i caratteri della cheratite ulcerosa che siamo abituati ad osservare spesso, e l'accordo clinico, anatomico batteriologico e sperimentale sembra abbastanza completo, e dà alle osservazioni una particolare importanza sulle altre congeneri, le quali, quasi sempre, mancano o dell'esame batteriologico, o dell'anatomico e molto spesso del controllo sperimentale.

Si discostano dalle ulceri corneali, finora studiate, per la loro genesi, perocchè esse sono state prodotte da speciali microrganismi, aventi caratteri differenti da quelli finora studiati, appartenenti al gruppo delle streptotricee, il cui potere patogeno, in tali affezioni, era del tutto sconosciuto.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA VIII.

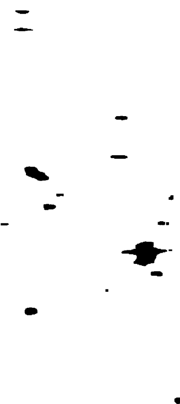
FIGURA I. Preparato da una coltura di 48 ore su siero di sangue di cavallo (osservazione 2ª).
FIGURA II e III. Preparati da colture in gelatina di un mese circa.
FIGURA V. Preparato da coltura in brodo di 24 ore, all'epoca dell'isolamento, dopo il primo passaggio nel coniglio.
FIGURA IV. Preparato da vecchia coltura su agar (1ª osservazione).
FIGURA VI. Preparato da vecchia coltura in brodo.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA IX.

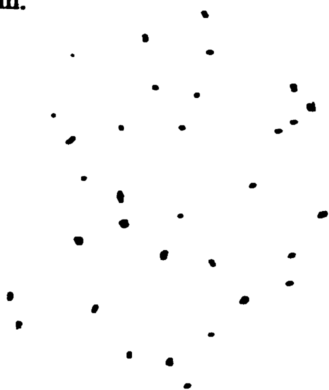
FIGURA I. Il fotogramma rappresenta una sezione di cornea di coniglio, in cui si nota interruzione dell'epitelio e bowman, infiltrazione circoscritta degli strati superficiali e divaricamento delle lamelle corneali sottostanti.
FIGURA II. Il fotogramma rappresenta una sezione di cornea in cui si nota una infiltrazione circoscritta con epitelio infossato nel sito della puntura d'innesto.
FIGURA III. Raffigura una sezione di cornea in cui si nota interruzione dell'epitelio e bowman, distruzione ed infiltrazione di gran parte degli strati corneali ed interruzione qua e là della descenet.
FIGURA IV. Rappresenta una sezione di cornea di coniglio in cui, pur essendo l'epitelio intatto, si nota una infiltrazione a tutto spessore della cornea, che interessa principalmente gli strati profondi con perforazione della descenet.
FIGURA IV. Rappresenta una sezione di cornea, in cui il processo ulcerativo, molto progredito, ha distrutto e disgregato gran parte delle lamelle corneali.
FIGURA VI. Rappresenta una sezione di cornea, in cui si notano microrganismi sparsi tra le lamelle corneali.

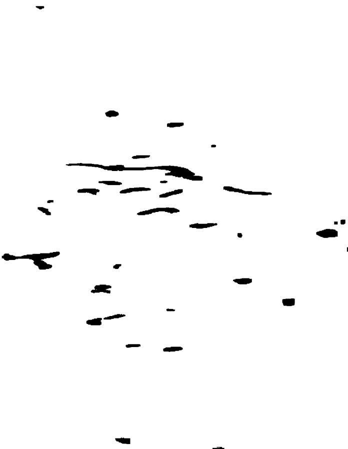
I.





III.





VI.



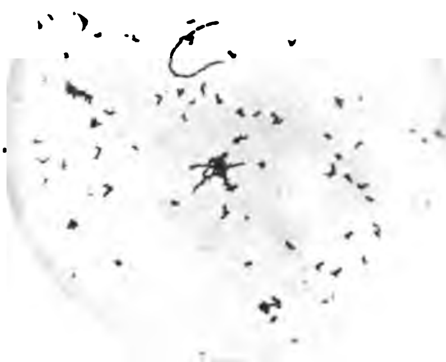


[illegible]

I.



II.



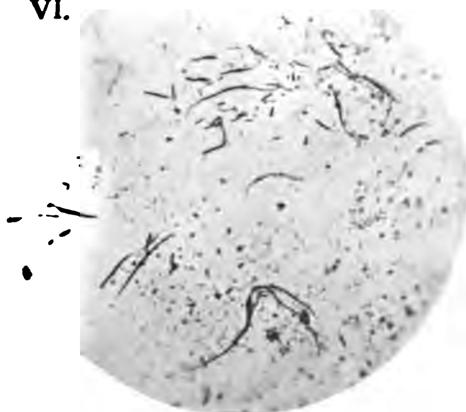
III.



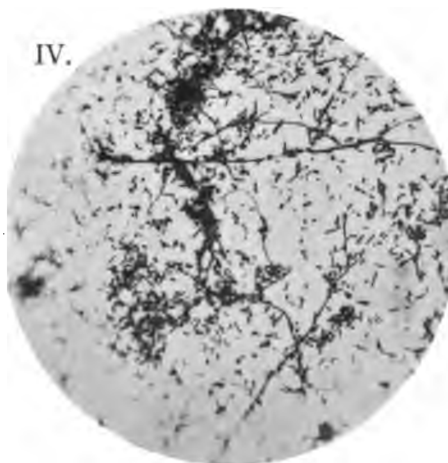
V.



VI.



IV.



Phototypie J. B. Obernetter, München.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA

Azione della polvere di carbone sui microrganismi, con speciale riguardo allo sviluppo della tubercolosi nei polmoni antracotici.

Contributo allo studio della rarità della tubercolosi fra gli operai soggetti ad inalare polveri di carbone

Ricerche sperimentali del dott. **ENRICO RONZANI**, aiuto.

È predominante da molto tempo, nel campo medico, l'idea che la polvere di carbone inspirata abbia una certa azione contraria allo sviluppo della tubercolosi polmonare.

L'Hirt, infatti, nel 1871, fu tra i primi a richiamare l'attenzione su tale fatto. Egli mostrò come tra i minatori di carbone della Slesia la morbilità per tubercolosi era di 1.3 su 100 malati, laddove invece saliva al 26 % dei malati fra gli operai sottoposti all'inalazione di altre polveri, specialmente inorganiche.

Anche in altri dati statistici pubblicati in seguito, nel 1881, dallo Schlockow prevalgono cifre favorevoli alla constatazione dell'Hirt; giacchè su 1000 membri di ciascuna delle Società operaie e di mutuo soccorso, qui sotto ricordate, erano affetti da tisi polmonare:

Società operaia	di Schamburg	(miniere	di carbon fossile)	1.9
Id.	della Slesia superiore. . .	id.	id.	2.0
Id.	di Vorm	id.	id.	3.9
Id.	della Slesia inferiore . . .	id.	id.	4.1
Id.	di Saarbrucker.	id.	id.	6.7
Id.	di Eschweiler	id.	id.	30.9

A confermare la rarità della tubercolosi fra i minatori di carbone vennero poi, nel 1891, alcuni dati statistici presentati, fra gli altri, dall'Ogle nel VII Congresso internazionale d'Igiene in Londra, che io qui mi limito a riferire in semplici valori relativi, dando il valore di 1 a quelli assoluti più bassi riguardanti i pescatori:

Pescatori	1.00
Minatori di carbone	1.16
Carpentieri e falegnami	1.87
Fornai	1.94
Muratori e scalpellini	2.30
Cardatori di lana	2.36
Lavoratori di cotone	2.49
Cavatori di pietra	2.81
Fabbri ferrai	3.40
Fabbricatori di lime	3.97
Pentolai	4.34
Minatori di stagno	6.32

Dieci anni dopo il Zeitlmann parlando, nel Congresso dei medici ferroviari in Baden-Baden, delle condizioni sanitarie dei macchinisti e fuochisti, e facendo rilevare che non si deve dare troppa importanza all'inspirazione di fumo, a cui questi sono soggetti, per essere la polvere di carbone asettica, portò, con la seguente statistica, un altro contributo all'opinione che la polvere di carbone esplichi un'azione contraria all'attecchimento della tubercolosi nell'apparato respiratorio.

Egli, infatti, riferì che su 1000 ferrovieri ammalarono di tubercolosi negli anni 1882-87:

CATEGORIA DI FERROVIERI	Ferrovie bavaresi	Ferrovie germaniche	Ferrovie austriache meridionali
Macchinisti e fuochisti	7.25	3.4	3.1
Conduttori	8.1	5.0	5.0
Personale d'ufficio	9.38	2.6	11.0

E similmente su 1000 ferrovieri di tutta la Germania si ebbero:

Macchinisti	casi di tubercolosi	3.88
Fuochisti	id.	4.72
Conduttori	id.	5.10

Il Trotter infine chiudeva, lo scorso anno, un suo lavoro sull'antracosi e tisi nelle miniere di carbone, dicendo sembrargli evidente una qualche influenza protettrice nella polvere di carbone inspirata dai minatori, notando

fra essi una mortalità ben rara per tubercolosi. Tanto più tale influenza gli sembrava evidente, perchè molti altri fattori favorevoli alla tisi circondano i minatori, nel distretto di Urban Bedlingtanschire, dove egli ha fatto le sue osservazioni cliniche, quali, ad esempio, il vivere agglomerati in case umide e mal ventilate, ed il sopportare un lavoro faticoso in una atmosfera poco pura. Aggiungasi poi che la mortalità per tale malattia è colà maggiore fra le donne, che vivono nelle case e non praticano la miniera.

Da tuttociò appare dunque ben fondata l'opinione, tanto diffusa nel campo medico, della relativa rarità della tubercolosi tra quelli operai che sono soggetti ad inalare polveri di carbone; e perciò si comprende come essa abbia eccitato patologi ed igienisti a cercare la ragione di tale fatto, specialmente per la considerazione che la tisi polmonare tra gli operai addetti a mestieri polverosi è invece più frequente che nelle altre classi.

L'Hirt, che, come hò detto, pare sia stato il primo a richiamare l'attenzione su tale fatto, credette che la polvere di carbone agisse nel senso di impedire l'aggravamento delle lesioni tubercolari; mentre l'Albrecht affermò invece, che l'inalazione di tale polvere diminuisce piuttosto la disposizione alla tubercolosi. Più tardi lo stesso Hirt, completando la sua precedente idea, manifestò l'opinione che il carbone possa avere una azione antisettica; ma tale idea non venne accettata dall'Arnold, il quale invece ammise un antagonismo tra tubercolosi ed antracosi, perchè le masse di polvere raccolte nel polmone sono, secondo lui, di impedimento allo sviluppo della tubercolosi.

Più tardi il Franz attribuì anche lui un potere disinfettante alla polvere di carbone, allorchè metteva in evidenza che la tubercolosi è ben rara fra i minatori di carbone, e che anche quando, per caso, entrano tra essi individui con sintomi di scrofola o con eredità sospetta nei riguardi della tubercolosi, si mantengono ordinariamente sani finchè lavorano in mezzo al carbone e diventano tubercolosi invece se tornano a lavorare fuori delle miniere.

Tralasciando altre pubblicazioni di questo genere, ma di minor conto, fatte prima della scoperta del bacillo di Koch, le quali, come dice il Guillot, potrebbero basarsi sull'errore, per il fatto che si potrebbero aver confusi i tubercoli dati dal bacillo specifico con forme tubercolari dovute all'infiammazione cronica per irritazione data dalla polvere stessa; e perchè l'interpretazione del fatto più che sull'esperienza diretta appare fondata sulla semplice opinione; si ha che, anche dopo tale scoperta, la rarità della tubercolosi fra gli individui sottoposti all'inalazione di polvere di carbone ha richiamata, per spiegarla, l'attenzione dei patologi e degli igienisti.

Il Löffler, infatti, nel Congresso di Berlino del 1889 per la lotta contro la tubercolosi, disse che i carbonai sono al riparo dalla tubercolosi per l'irritazione prodotta dalla polvere di carbone sulle vie linfatiche, le quali infiammate impediscono il diffondersi dei bacilli.

Anche il Racine, dichiarando che la tubercolosi tra i rispettivi minatori è una malattia rarissima, crede di riconoscere a tale polvere un'azione speciale

nel senso di essere dotata di un potere addirittura disinfettante. Presso a poco conclude il Beleites quando ritiene che la polvere di carbone inspirata sia poco favorevole allo sviluppo dei bacilli tubercolari. L'Idel poi (citato dal Papasotiriu) afferma che la polvere di carbone sia dotata del potere di imbeversi dei prodotti tossici del bacillo tubercolare, ai quali toglie così la facoltà di nuocere all'organismo.

Dal fin qui detto, risulta che, a spiegare il fatto di una bassa mortalità per tubercolosi fra gli individui esposti alla polvere di carbone, si attribuisce a questa, da molti autori, una azione più o meno specifica sul bacillo della tubercolosi, alcuni ritenendola senz'altro addirittura disinfettante. Ciò però non raccoglie l'unanime consenso; e parecchi, invece, tale azione negano cercando di dare al fatto diversa interpretazione.

Il Villaret, infatti, afferma che la tubercolosi polmonare si sviluppa indipendentemente dall'antracosi e contemporaneamente ad essa, giacchè nessuna polvere può produrre per sè stessa la tubercolosi, ma qualsiasi polvere può introdurre i germi specifici nell'albero respiratorio, dove più facilmente attecchiscono per i catarri bronchiali, cui vanno incontro gli operai addetti a mestieri polverosi. Perciò, pur classificando le polveri di carbone fossile, di legna, grafite, ecc., tra quelle che ledono in minor grado il polmone, conclude che non si deve credere che l'antracosi sia in antagonismo con la tubercolosi; alla quale anzi, sebbene in minor grado che le altre polveri, piuttosto predispone. E se tra i minatori di carbone la mortalità è realmente minore, bisogna, secondo lui, anche considerare le condizioni migliori nelle quali essi, sia per la loro buona organizzazione, sia per la scelta degli individui, tra i quali sono esclusi i deboli, vengono a trovarsi in confronto con altri operai sottoposti all'inalazione di altre polveri.

Anche il Roth, nel 1901, scrisse che i minatori di carbone sono, in certi distretti, più soggetti alla tubercolosi che in altri; e crede che la differenza sia dovuta alla qualità della polvere, a seconda che essa sia in minore o maggiore quantità mescolata a quella di altri minerali più o meno ledenti le vie respiratorie; e crede che per poter attribuire alla polvere di carbone un qualsiasi potere disinfettante siano ancora necessarie ripetute esperienze sul riguardo.

Il Carrien, pur opponendosi all'opinione di quelli che la dichiarano nociva, non crede sia nella polvere di carbone alcuna azione protettiva contro la tubercolosi polmonare; mentre l'Oliver, nella sua relazione fatta lo scorso anno sulla diffusione della tubercolosi nelle miniere, sostiene che un uomo, che sia disposto a tale infezione, acquista una maggiore disposizione a contrarla, e che la polvere di carbone nel polmone non fa che affrettare le tendenze distruttive della malattia. Anche il Lanceraux, nell'illustrazione di un caso, nel quale una forte antracosi era associata a tubercolosi, sostiene che la prima predispone alla seconda.

Due sono dunque le opinioni predominanti, per dilucidare questa apparente minore disposizione alla tubercolosi per parte degli operai

esposti all'inspirazione della polvere di carbone: una che attribuisce a tale polvere un potere disinfettante o per lo meno protettivo; l'altra che, negando ciò, attribuisce tale fatto ad altri fattori ed altre circostanze non ben determinate. Onde a ragione l'Ogle, il quale, come abbiamo visto, presentò, nel VII Congresso internazionale d'Igiene, dati statistici che sono favorevoli all'opinione di una minor disposizione dei carbonai per la tubercolosi, crede la dilucidazione di tale minor disposizione debba essere ancora oggetto di ulteriori ricerche. Ed io ho voluto perciò intraprendere sul riguardo una serie di esperimenti, a fine di portare un contributo allo studio di questo argomento, tanto importante anche dal punto di vista dell'igiene industriale.

***

A tale scopo, ho voluto anzitutto persuadermi se il carbone abbia in *vitro* un qualche potere disinfettante od almeno semplicemente antisettico sui principali microrganismi patogeni.

Già il Papasotiriu aveva, nel 1901, fatti alcuni esperimenti in questo senso, adoperando i bacilli della pseudo-tubercolosi e quelli della tubercolosi umana, ed i suoi risultati, per riguardo a questi microrganismi, furono negativi. Lo sviluppo di essi infatti si avverava regolarmente nell'agar glicerinato mescolato con polvere di diversi carboni, come anche ciò si era avverato in alcuni esperimenti, fatti l'anno innanzi dal Fränkel Wien, il quale (come risulta dalla citazione che ne fa il Papasotiriu) aveva voluto controllare il risultato terapeutico negativo di iniezioni di polvere di carbone nelle articolazioni affette da tubercolosi.

Io ho esteso tale ricerca ai principali microrganismi patogeni, che mi offrivano il vantaggio di poter fare le mie esperienze con culture in brodo, nelle quali il contatto fra microrganismi e carbone era maggiormente assicurato che non in terreno solido, in cui facilmente rimangono aree più o meno grandi senza carbone, e nelle quali perciò possono capitare i germi e svilupparsi senza risentire influenza dell'immediato contatto col carbone stesso.

Versato in provette, contenenti circa 5 cmc. di brodo sterilizzato, un cmc. di polvere sterilizzata (1) di carbone vergine, di coke e di carbone vegetale, mescolai tutto con prolungata agitazione. Infettai quindi tali provette

(1) La polvere di carbone veniva sterilizzata al calor secco a 140° per mezz'ora distesa in strato sottile entro scatole Petri.

con i sottoindicati microrganismi ed insieme a culture semplici di controllo le lasciai in termostato a 37° per 24 ore, a capo delle quali così nelle culture di controllo come in quelle con carbone si vedeva anche ad occhio nudo evidentissimo lo sviluppo di microrganismi; dei quali procedevo allo studio ulteriore per la loro identificazione, e per vedere con successive culture se avessero subito qualche diminuzione nella facoltà di riprodursi di fronte ad altri della stessa specie che col carbone non erano stati punto in contatto.

Riassumo i risultati nella seguente tabella:

TABELLA *A*.

GERME ADOPERATO	Sviluppo in brodo con carbone vergine	Sviluppo in brodo con carbone coke	Sviluppo in brodo con carbone vegetale
Carbonchio ematico	+	+	+
Tifo	+	+	+
B. coli	+	+	+
Difterite.	+	+	+
Morva	+	+	+
Peste bubbonica	+	+	+
Colera asiatico	+	+	+
Diplococco pneumonico.	+	+	+
Stafilococco piogene aureo	+	+	+
Streptococco piogene.	+	+	+

Questi risultati sono già evidentemente dimostrativi della mancanza di un potere anche solamente antisettico nella polvere dei diversi carboni; ma considerando come anche parecchi farmacologi attribuendo al carbone, specie vegetale, un valore antisettico, lo consigliano nelle infezioni intestinali (tifo, dissenteria, ecc.) allo scopo di fargli spiegare un'azione non solo assorbente dei gas, ma anche ostile alla vita dei microbi (Binz, Tamburini, Soulier), ho creduto variare alquanto la precedente serie di esperimenti, allo scopo di aumentare ancor maggiormente il contatto dei vari germi adoperati colle varie qualità di carbone prese in considerazione.

E perciò, in culture di 24 ore in brodo, fatte coi predetti microrganismi patogeni, aggiunsi della polvere sterilizzata finissima, ora

di carbone vergine, ora di carbone coke ed ora di carbone vegetale, ed in tale quantità da formare colla coltura in brodo come una pasta. Dopo 24 ore che tale miscela era rimasta al termostato a 37°, trasporti di essa in brodo sterile davano sempre rigoglioso sviluppo dei rispettivi microrganismi.

Dunque dalle su riferite mie esperienze e da quelle del Papasotiriu e Fränkel-Wien risulta *che la polvere di carbone vergine, coke e vegetale, non è dotata di alcun potere disinfettante o magari solamente antisettico.*

***

Constatato che la polvere dei diversi carboni non è dotata di potere antimicrobico, ho voluto assicurarmi se nella polvere dei diversi carboni e nell'interno dei grossi pezzi di essi si trovino, nelle condizioni normali, microrganismi viventi, in genere, e patogeni in specie.

A tale scopo prelevai campioni di polvere nelle varie carbonaie, e dai monti delle diverse specie di carboni, e precisamente dove la polvere era più abbondante, giammai però vicino al pavimento; e per prelevarli mi servii di un cucchiaio di platino, che sterilizzavo alla fiamma sul posto, ad ogni presa. La polvere più superficiale veniva allontanata, per prendere quella che si trovava più profondamente, la quale, raccolta in bevute di Erlenmeyer sterilizzate, veniva portata in laboratorio; dove in quantità di $^1/_2$ cmc. era versata in 100 cmc. di acqua distillata e sterilizzata, dalla quale, previa accurata agitazione, facevo culture piatte in gelatina con $^1/_4$, $^1/_2$, $^3/_4$, 1 cmc. di essa.

Nella seguente tabella riassumo i risultati quantitativi relativi a questa ricerca, notando che il conteggio dei germi veniva fatto dopo che le piastre erano rimaste per quattro giorni nel termostato a 22°, una ulterione permanenza venendo sconsigliata per lo svilupparsi di numerose colonie fondenti.

TABELLA *B*.

Qualità di carbone	Luogo di presa	Numero dei germi in 1 cc. di polvere di carbone			
		fondenti	non fondenti	muffe	Totale
Carbone minerale vergine.	Carbonaia Boschetti I	10,000	119,000	1,000	120,000
Id. . .	Id. Gazometro I	200	630	3,600	4,430
Id. . .	Id. Gazometro II	2,000	120,000	2,500	124,500
Id. . .	Id. Lampronti I	4,700	470,000	400	475,100
Carbone coke	Id. Boschetti II	1,250	823,000	750	825,000
Id.	Id. Gazometro III	24,000	150,000	1,000	175,000
Id.	Id. Gazometro IV	13,000	77,000	400	90,400
Id.	Id. Boschetti III	3,000	200,000	3,000	206,000
Carbone vegetale	Id. Boschetti IV	100	205,000	50	205,150
Id.	Id. Via Zattere I	65,000	1,300,000	15,000	1,400,000
Id.	Id. Lampronti II	1,600	351,000	2,200	354,800
Id.	Id. Boschetti V	800	115,000	600	116,400

Per quanto riguarda le specie dei germi sviluppatesi, quelle che ho potuto identificare sono:

α) nel carbone minerale vergine: *b. fluorescens liquefaciens, b. liquefaciens magnus, b. megaterium, cladotrix cromogenes del Gasparini, b. proteus vulgaris; molte colonie di bacilli e cocchi cromogeni* (*b. citreus, candidus, luteus, aureus, ecc.*)*; penicillium glaucum, aspergillus niger;*

β) nel carbone coke: *b. liquefaciens, b. mycoides, b. piocianeus, b. luteus, streptococcus albus, b. subtilis, e molti cromogeni;*

γ) nel carbone vegetale: *b. proteus vulgaris, b. fluorescens liquefaciens, micrococcus citreus liquefaciens; megaterium, diplococco luteo; penicillium glaucum, aspergillus fumigatus.*

Allo scopo di assicurarmi se nella polvere di carbone, coi germi saprogeni, vi fossero anche dei patogeni che non potessero svilupparsi per caso nella gelatina, o per il loro scarso numero, o perchè in gelatina non coltivabili, introducevo in una saccoccia praticata sottocute alle cavie una certa quantità di polvere dei diversi carboni prelevati nei modi predetti; ed il rispettivo risultato trovasi riassunto nella seguente tabella.

TABELLA *C.*

Qualità di polvere di carbone inoculata	Deposito dal quale fu presa la polvere	Animale inoculato	Sede della inoculazione	Risultato
Carbone minerale vergine	Carbonaia Boschetti I	Cavia	Sottocute	Nessuna alterazione locale nè generale.
Id. id.	Id. Gazometro I	id.	id.	Id. id.
Id. id.	Id. Gazometro II	id.	id.	Un ascesso nel punto d' innesto.
Id. id.	Id. Lampronti I	id.	id.	Nessuna alterazione locale nè generale.
Carbone coke	Id. Boschetti II	id.	id.	Id. id.
Id.	Id. Gazometro III	id.	id.	Id. id.
Id.	Id. Gazometro IV	id.	id.	Id. id.
Id.	Id. Boschetti III	id.	id.	Id. Id.
Carbone vegetale	Id. Boschetti IV	id.	id.	Id. id.
Id.	Id. Via Zattere I	id.	id.	Un ascesso nel punto d'innesto.
Id.	Id. Lampronti II	id.	id.	Nessuna alterazione locale nè generale.
Id.	Id. Boschetti V	id.	id.	Id. id.

Per vedere, poi, se anche entro ai grossi pezzi di carbone si trovano microrganismi in numero più o meno rilevante, pulivo per bene la superficie dei pezzi più grossi che potevo avere, e quindi dopo averla fiammeggiata con una fiamma Bunsen, li spaccavo mercè uno scalpello sterilizzato alla fiamma per mettere allo scoperto la parte centrale. Da questa con un trapano sterilizzato asportavo una certa quantità di polvere che facevo cadere entro una scatola Petri sterilizzata; dalla quale, infine, prelevavo la quantità necessaria per l'analisi suddetta, pel resto, usai le stesse modalità dell'esperienza precedente.

Nella tabella seguente riassumo i risultati quantitativi.

TABELLA *D*.

Qualità di carbone	Denominazione	Numero dei germi in 1 cc.			
		fondenti	non fondenti	muffe	Totale
Carbone minerale vergine	New Pelton Main. .	20	880	140	940
Id. . .	Cowpen.	300	3,000	100	3,400
Id. . .	Rüdolf	0	20	48	68
Id. . .	Cardiff	0	300	60	360
Carbone coke	Molto compatto. . .	100	180	85	365
Id.	Poco compatto . . .	60	1,200	100	1,360
Id.	Molto compatte. . .	55	60	100	215
Carbone vegetale	Comune.	180	200	65	445
Id.	Di faggio	68	220	32	320
Id.	Comune.	110	160	100	370

Le specie dei germi identificate sono:

α) nel carbone minerale vergine: *cladotrix cromogena del Gasperini*, *b. fluorescens liquefaciens*, *b. liquefaciens*, *b. aureus*, *b. mycoides*. *b. citreus*, *b. luteus*, *penicillium rubrum*, *album*, *aspergillus fumigatus*, *albus*;

β) nel carbone coke: *b. fluorescens liquefaciens,* molti cocchi e bacilli cromogeni;

γ) nel carbone vegetale: *b. liquefaciens*, *b. citreus*, *b. proteus vulgaris*, *b. aureus; penicillium glaucum*, *rubrum*, *aspergillus fumigatus.*

Anche per la ricerca dei germi patogeni ho usato lo stesso metodo tenuto nella ricerca sulla polvere, ed *i risultati furono del tutto negativi.*

Da quanto precede, dunque, risulta, che non solo la polvere di carbone dei diversi carboni, raccolta nelle carbonaie, contiene numerosissimi microrganismi, fra i quali alcuni patogeni (*piogeni*), ma che ne contengono, fin nella loro parte centrale, anche i grossi pezzi di carbone d'ogni specie.

E se in questi nessun germe patogeno ho riscontrato, ciò non vuol dire che non vi si possa talvolta rinvenire, giacchè anch'essi, come i saprogeni, possono eventualmente penetrarvi dall'esterno.

Che i germi riscontrati nell'interno dei grossi pezzi di carbone vegetale e di coke, vi siano penetrati dall'esterno, deve ritenersi fuori d'ogni dubbio, sapendosi come tali carboni vengano ottenuti in seguito ad azione di altissima temperatura. Il solo dubbio potrebbe esistere per il carbone vergine minerale, quantunque, allorchè si pensi ai luoghi donde esso si estrae, ogni incertezza dovrebbe venir meno. A toglierla in ogni modo, ho creduto di praticare alcune ricerche, che se non possono dimostrare la sterilità originaria del carbone vergine minerale (non potendo io praticare l'esame diretto su carboni prelevati immediatamente e con le debite cautele dalle miniere), dimostrano che in esso i microrganismi vi possono senza dubbio penetrare dall'esterno.

A tale scopo, mescolata con 10 litri d'acqua sterilizzata una cultura di *micrococco violaceo*, bagnavo con tale acqua, quattro volte al giorno e per la durata di 15 giorni, dei grossi pezzi di carbone minerale, alcuni nel senso della venatura, altri nel senso ad essa perpendicolare: a capo di tale tempo poi ricercavo con cultura in terreni liquidi e solidi il *micrococco violaceo* nella polvere ottenuta, nello stesso modo innanzi indicato, dal centro di tali grossi pezzi di carbone.

Come la seguente tabella dimostra, il *risultato fu sempre positivo in quelli bagnati nel senso parallelo alle stratificazioni.*

TABELLA *E.*

Qualità di carbone	Bagnato in direzione	Compattezza	Presenza al centro del micrococco violaceo
Carbone vergine minerale	Parallelamente agli strati	Molto compatto .	+
Id. . .	Id. . .	Poco compatto. .	+
Id. . .	Perpendicolarmente agli strati.	Molto compatto .	—
Id. . .	Id. . .	Poco compatto. .	—

Riassumendo i risultati di questa serie di ricerche, si ha: *che la polvere di carbone, almeno nei depositi di esso, non è asettica come qualcuno aveva supposto, ma contiene invece moltissimi microrganismi, fra i quali si riscontrano anche dei piogeni; che nell'interno dei grandi pezzi di carbone i microrganismi non mancano, e che vi giungono dall'esterno per penetrazione nel senso parallelo alle rispettive stratificazioni.*

***

Constatato che la polvere dei diversi carboni non è dotata di potere antimicrobico, e che nella polvere e nei grossi pezzi di carbone raccolti nei depositi esistono germi numerosi, fra i quali anche dei patogeni, ho creduto opportuno di istituire delle ricerche per vedere quali fossero dal punto di vista batteriologico le condizioni dell'aria delle carbonaie, e precisamente mentre in esse ferve maggiormente il lavoro, e l'ambiente perciò è più ricco di polvere.

A tale scopo suddivisi i depositi in tre categorie, secondo la specie di carbone in essi contenuta (*depositi di carbone vergine minerale, di carbone coke e di carbone vegetale*); feci l'esame batteriologico dell'aria di essi, contemporaneamente all'esame dell'aria esterna, servendomi, con tutte le note norme di tecnica, dell'apparecchio di Straus-Wurtz. Tale apparecchio veniva posto all'altezza di m. 1.50 dal terreno, vicino agli operai, mentre lavoravano ad insaccare od a scaricare il carbone, e veniva regolata l'aspirazione in modo che in 50 minuti primi passassèro 10 litri d'aria.

Per ogni deposito segnavo la cubatura, la temperatura, il numero degli operai che vi lavoravano e la quantità all'incirca del carbone depositato, per trarne, se del caso, le relative considerazioni.

Il conteggio dei germi veniva eseguito dopo che le scatole Petri, nelle quali era stata versata la gelatina dell'apparecchio di Straus-Wurtz, e l'apparecchio stesso con la poca gelatina in esso rimasta, erano stati tenuti per quattro giorni nel termostato a 22°.

Nella seguente tabella riassumo i risultati quantitativi relativi a questa ricerca:

TABELLA F.

Qualità di carbone	Indicazione dei diversi depositi		Data delle ricerche — (1904)	Cubatura dei magazzini in m³.	Temperatura in gr. C.		Numero degli operai che lavorano	Quantità di carbone esistente in tonellate	Numero dei germi riscontrati in 1 litro d'aria dei depositi				Numero totale dei germi in 1 litro d'aria esterna
					Esterna	Interna			fondenti	non fondenti	muffe	Numero totale	
Carbone minerale vergine.	Carbonaia	Boschetti I .	3 marzo	307	9	7	1	50	25	69	6	100	5
Id. id.	Id.	Gazometro I .	1 aprile	1,560	13	12	2	100	1	30	89	120	28
Id. id.	Id.	Gazometro II	9 aprile	1,040	14	12	4	90	65	1,414	1	1,480	16
Id. id.	Id.	Lampronti I.	21 aprile	208	15	15	2	60	3	372	30	406	80
Carbone coke	Id.	Boschetti II .	9 marzo	300	9	8	1	100	2	25	55	82	70
Id.	Id.	Boschetti III.	11 marzo	330	10	10	1	80	12	226	2	240	29
Id.	Id.	Gazometro III	9 aprile	1,500	14	13	3	200	17	1,390	2	1,100	16
Id.	Id.	Gazometro IV	10 aprile	1,000	15	14	5	80	10	2,300	10	2,320	9
Carbone vegetale. . . .	Id.	Boschetti IV.	9 marzo	204	8	8	3	40	3	960	2	965	24
Id.	Id.	Via Zattere I	1 aprile	315	12	11	2	40	56	750	330	1,136	115
Id.	Id.	Lampronti II	21 aprile	200	18	18	2	30	32	337	1	370	8
Id.	Id.	Boschetti V .	23 aprile	400	12	12	3	50	60	1,210	12	1,292	91

Le specie dei germi identificate sono:

α) nei depositi di carbone vergine minerale: *b.. fluorescens liquefaciens*, *b. proteus vulgaris*, *b. luteus* e molti altri cromogeni; *penicillium glaucum*, *aspergillus albus;*

β) nei depositi di carbone coke: *micrococcus citreus liquefaciens*, *b. fluorescens liquefaciens, b. aureus*, *b. subtilis*, *penicilli* ed *aspergilli*:

γ) nei depositi di carbone vegetale: *b. megaterium*, *micrococcus luteus*, *diplococcus luteus*, *b. fluorescens-liquefaciens*, molti cromogeni.

Allo scopo di assicurarmi se nel pulviscolo atmosferico delle carbonaie vi fossero germi patogeni, esponevo per alcun tempo nei suddetti depositi di carbone anche delle capsule di Petri contenenti acqua sterile, la quale, poi, raccolta con le necessarie cautele in robusta provetta sterilizzata, veniva nel più breve tempo possibile centrifugata, ed il sedimento di questa inoculato a delle cavie.

Nella seguente tabella sono riassunti i risultati:

TABELLA G.

Qualità di carbone in deposito	Pulviscolo del deposito	Animale inoculato	Sede della inoculazione	Risultato
Carbone vergine minerale	dei Boschetti I	Cavia	Sottocute	Nessuna alterazione locale, nè generale.
Id.	del Gazometro I	id.	id.	Id. id.
Id.	del Gazometro II	id.	id.	Un ascesso nel punto d'innesto.
Id.	dei Lampronti I	id.	id.	Nessuna alterazione locale, nè generale.
Carbone coke	dei Boschetti II	id.	id.	Id. id.
Id.	dei Boschetti III	id.	id.	Id. id.
Id.	del Gazometro III	id.	id.	Id. id.
Id.	del Gazometro IV	id.	id.	Id. id.
Carbone vegetale	dei Boschetti IV	id.	id.	Un ascesso nel punto d'innesto.
Id.	di Via Zattere I	id.	id.	Nessuna alterazione locale, nè generale.
Id.	del Lampronti II	id.	id.	Id. id.
Id.	dei Boschetti V	id.	id.	Id. id.

Da quanto precede dunque risulta che:

a) *L'aria dei depositi di carbone, specialmente mentre in essi si lavora, è ricchissima di microrganismi, il cui numero varia di poco col variare della qualità del carbone;*

b) *tale numero invece è in proporzione diretta del lavoro che in siffatti depositi si compie, e quindi della maggior polvere che in essi si solleva*;

c) *nel pulviscolo atmosferico dei depositi di carbone si possono trovare dei germi patogeni;*

d) *gli operai che lavorano nei depositi di carbone respirano colla polvere di questo una notevole quantità di germi, di gran lunga superiore a quella che respirerebbero all'esterno.*

***

Per tutte le esperienze fin qui riferite, dunque, la polvere di carbone non è dotata di potere disinfettante nè può ritenersi asettica; e con essa quindi gli operai possono inspirare germi di malattie infettive, come lo dimostra la ricchezza di microrganismi nell'aria delle carbonaie, specialmente quando vi ferve il lavoro.

Però da una parte non si può escludere senz'altro con tali esperienze un'azione, per così dire, specifica della polvere di carbone contro il bacillo della tubercolosi (chiaramente invocata, fra gli altri dal Vernois), anche perchè, come ho innanzi notato, i risultati del Papasotiriu, per aver egli dovuto esperimentare su terreni solidi, vanno incontro all'obbiezione di un non sicuro contatto fra carbone e bacillo.

D'altra parte abbiamo visto che altri, come l'Albrecht, parlano di una diminuita disposizione del polmone antracotico a divenir tubercoloso; altri ancora, come il Löffler, invocano un'irritazione delle vie linfatiche, che con la loro infiammazione verrebbero a presentare un impedimento al diffondersi del bacillo; e l'Idel, infine, crede perfino che la polvere di carbone spieghi in tal caso un'azione protettrice, assorbendo i prodotti tossici del bacillo tubercolare.

Solamente esperimenti diretti sul vivo potevano dimostrare se un'azione specifica fosse realmente ed efficacemente posseduta dal carbone verso il bacillo della tubercolosi; perchè, se questo si fosse sviluppato abbondantemente in polmoni fortemente antracotici, ogni questione di presunta specificità o meno, sarebbe venuta a scomparire pel fatto che essa, in ogni modo, non avrebbe campo di esplicarsi nell'ambiente polmonare, magari pel solo fatto che i bacilli

possono trovare nel polmone punti di attecchimento, in cui il carbone manchi. E similmente venivano a perdere ogni valore anche le interpretazioni che non si fondano su azione microbicida, ma invece o prendono in considerazione la disposizione individuale, ovvero un'azione che potrebbe dirsi d'indole più o meno meccanica.

Perciò ho pensato di rendere prima antracotiche, nel modo che esporrò, alcune cavie, e quindi di farle respirare in ambiente carico di polvere infetta da bacillo tubercolare.

Introducevo le cavie che volevo rendere antracotiche, in cassette di legno, di cui una faccia era fornita di una lastra, per sorvegliarne l'interno, un'altra di un foro per l'introduzione di un tubo comunicante con un polverizzatore, ed il coperchio aveva due fori per lo scambio dell'aria. Per ognuna delle tre specie di carbone, ho adoperata una cassetta a parte, in ciascuna delle quali introducevo cinque cavie, che per un periodo di due mesi, due volte al giorno e due ore per volta, respiravano in esse un'aria carica della speciale polvere di carbone, che proveniva dai rispettivi polverizzatori funzionanti interrottamente.

A capo del secondo mese, per assicurarmi se nelle cavie adoperate avevo con questo metodo ben provocata l'antracosi polmonare, ne uccisi una per ciascuno dei tre gruppi corrispondenti alle tre specie di carbone, ed all'autopsia di esse riscontrai completo annerimento dei polmoni, i quali al taglio pure si presentavano nerastri ed alla pressione lasciavano uscire un liquido schiumoso color inchiostro. All'esame microscopico delle sezioni, molti alveoli polmonari apparivano ripieni di particelle di carbone; altri con le pareti più o meno ricoperte di tali particelle, che si riscontravano pure nei vasi linfatici, nei piccoli bronchi, e sparse nel tessuto perialveolare.

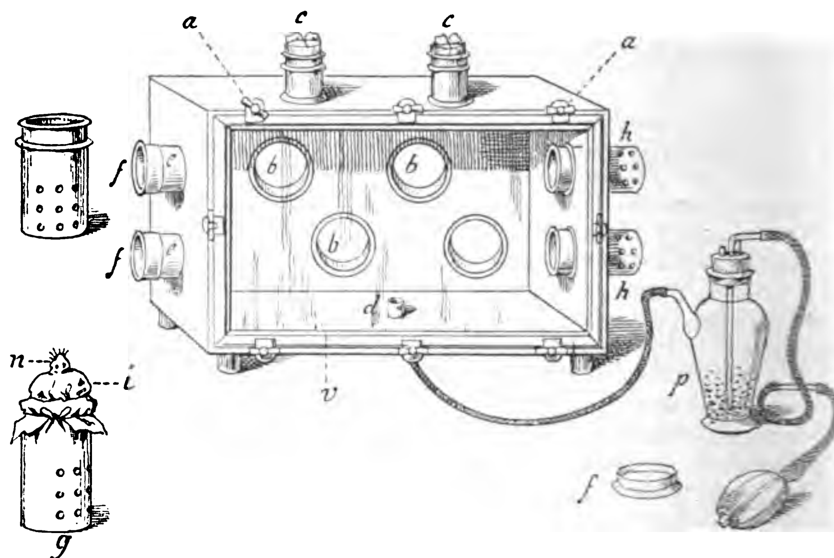
Assicurato così che l'antracosi era stata completamente provocata, esposi le rimanenti cavie all'inspirazione di polvere mista a bacilli tubercolari. Tale inalazione aveva luogo alternativamente ogni cinque giorni, seguitando, nei giorni d'intervallo, ad esporre le cavie, nel modo predetto, all'inspirazione d'aria ricca di semplice polvere di carbone.

Per l'inalazione di polvere infetta di bacilli tubercolari, io non ho voluto seguire i metodi che sono comunemente adoperati, per provocare l'infezione per le vie respiratorie, perchè in essi, compreso quello proposto dal Buchner, bisogna introdurre tutto l'animale nell'ambiente dove si polverizzano i germi con cui si esperimenta, e quindi non si ha alcuna garanzia che l'innesto anzichè per le vie respiratorie, o solo per esse, non avvenga anche per il tubo digerente e per la superficie cutanea. Oltrecchè tutto il corpo dell'animale restando infettato, possono o derivarne cause di alterazione dei risultati delle esperienze, ovvero danni a chi deve poscia maneggiare l'animale stesso.

Dovendo io cercare ogni modo d'infettare, più che fosse possibile solo per le vie respiratorie, gli animali in esperimento, ho fatto costruire una speciale cassetta, che mi pare meglio corrisponda a questo scopo.

Essa è di lamina di zinco delle dimensioni di cm. 40 × 25 × 25; e come si rileva dall'annessa figura, una delle sue faccie maggiori, allo scopo di

introdurre e sorvegliare gli animali, è costituita da un telaio *v* amovibile, portante una lastra di vetro, e fornito internamente di una guarnizione di gomma per meglio assicurarne la chiusura ermetica che si ottiene a pressione mediante viti a farfalla *a*. Le altre pareti laterali sono fornite di fori *b* del diametro di mm. 75 disposti alternativamente in due linee orizzontali, l'una sovrastante all'altra; mentre nella parete superiore s'aprono due specie



di caminetti *c* del diametro di 30 millimetri, che si chiudono con tappi di ovatta, e servono per lo scambio d'aria. Nel centro del fondo s'apre un foro *d* di 15 millimetri di diametro per l'introduzione nella cassetta del tubo del polverizzatore. I predetti grandi fori *b* delle pareti laterali sono forniti all'esterno di un cercine *e* per innestarvi il rispettivo coperchio *f* ovvero per sostenere dei cilindri dello stesso metallo destinati a ricevere l'animale.

Questi cilindri *g* sono dell'altezza di cm. 14 e di tale diametro da entrare a sfregamento dall'interno verso l'esterno nei grandi fori predetti. Nella parte superiore ed esternamente portano due piccoli cercini *x* e *y*, alla distanza di 15 millimetri l'uno dall'altro; dei quali quello inferiore *y*, adattandosi bene alle pareti della cassetta, serve a chiuderne completamente il foro nel quale il cilindo stesso è stato introdotto; mentre l'altro *x* serve per mantenere ferma la tela, che, come dirò, viene a ricoprire la testa dell'animale. Allo scopo di procurare una circolazione d'aria attorno al corpo dell'animale, la superficie laterale di questi cilindri è fornita di numerosi fori del diametro di circa un centimetro, mentre uno di grandezza tripla si trova anche nel fondo.

Dentro tali cilindri *g* si pongono le cavie, che, chiuse in un ambiente così ristretto. non possono muoversi, e per l'altezza dei cilindri stessi esse sporgono nell'interno della cassetta solo con la testa; la quale a sua volta viene ricoperta di pezzi quadrati di sottile tela impermeabile *i* avente nella

parte centrale un foro triangolare di mm. 15 di lato. Per questo foro, di cui uno degli angoli deve corrispondere alla radice del naso, rimangono scoverte in tal modo solo le narici *n*, giacchè la tela involgente la testa dell'animale a guisa di cuffia, viene quindi prima legata attorno al collo dell'animale stesso mediante una fettuccia, più strettamente che sia possibile, e quindi fissata col suo prolungamento attorno allo spazio esistente fra i due cercini del cilindro.

Assicurato e immobilizzate così le cavie entro i cilindri, questi s'introducono dall'interno della cassetta nei fori delle pareti come si vede nella figura *h*, e chiuso con le viti a farfalla, il telaio a lastra di vetro, si pone in funzione il polverizzatore *p*, il cui tubo, come ho innanzi detto, penetra per il piccolo foro del fondo dell'apparecchio.

Tenni parecchie volte, per più di due ore, gli animali in tali condizioni insufflando interrottamente nella cassetta la polvere infetta, e non ebbi mai la morte di qualche animale.

Ad operazione terminata, dopo che si è aspettato la completa deposizione della polvere, si apre la cassetta, si estraggono ad uno ad uno i cilindri con le cavie, e si tuffa entro un recipiente con dell'acqua la testa dell'animale avvolta ancora dalla tela, sia per non sollevare polvere slegando il bavaglio, sia per lavare contemporaneamente la parte esposta delle narici. Naturalmente si procede infine alla disinfezione dell'apparecchio e delle tele adoperate.

Il materiale da polverizzare veniva preparato mescolando a polvere di carbone fina considerevole quantità di sputi tubercolari, che all'esame microscopico si mostravano ricchi di bacilli specifici; e tale pasta al riparo di ogni altro inquinamento veniva posta in termostato a 37° ad essiccare per essere quindi di nuovo ridotta in polvere. Ho scelto gli sputi di individui tubercolosi, anzichè culture pure di bacilli tubercolari, per mettermi nelle condizioni più naturali possibili.

In ogni esperimento con 6 cavie antracotiche, esponevo nel predetto modo all'inspirazione di polvere infetta anche due cavie di controllo; ed appunto per evitare che in esse si venissero a stabilire condizioni presso a poco simili a quelle antracotiche, alla polvere di carbone sostituii, nel prosieguo dell'esperimento, la polvere di licopodio per preparare, col procedimento ora descritto, il materiale infetto da polverizzare.

Ogni inalazione durava un'ora; e siccome i bacilli tubercolari nella polvere così preperata, venivano ad essere relativamente scarsi, per avere preferito di preparare il materiale infetto con sputi anzichè con colture, l'ho ripetuta per 5 volte per tutte le cavie, con l'intervallo di alcuni giorni fra l'una e l'altra operazione.

Ed eccone i risultati:

a) Cavie n. 4, i cui polmoni erano stati resi antracotici con polvere di *carbone vergine minerale:*

1ª morì dopo 130 giorni. Tubercolosi generale e locale;
2ª morì dopo 60 giorni. Non sezionata perchè perduta per equivoco;
3ª morì dopo 145 giorni. Tubercolosi polmonare, pleurite adesiva;
4ª morì dopo 235 giorni. Tubercolosi polmonare, pleurite.

b) Cavie n. 4, i cui polmoni erano stati resi antracotici con *polvere di carbone coke:*

1ª morì dopo 180 giorni. Tubercolosi generale e locale;
2ª morì dopo 200 giorni. Tubercolosi polmonare;
3ª morì dopo 160 giorni. Tubercolosi polmonare e pleurite;
4ª morì dopo 240 giorni. Tubercolosi generale e locale.

c) Cavie n. 4, i cui polmoni erano stati resi antracotici con *polvere di carbone vegetale:*

1ª morì dopo 155 giorni. Tubercolosi generale e locale;
2ª morì dopo 160 giorni. Tubercolosi generale e locale;
3ª morì dopo 175 giorni. Tubercolosi polmonare con pleurite;
4ª uccisa dopo 240 giorni. Tubercolosi polmonare.

d) Cavie n. 4 *di controllo:*

1ª morì dopo 180 giorni. Tubercolosi generale e locale;
2ª morì dopo 200 giorni. Tubercolosi polmonare e pleurite adesiva:
3ª uccisa dopo 240 giorni. Tubercolosi polmonare.
4ª uccisa dopo 240 giorni. Sana.

Da quanto precede, risulta evidente che *le varie polveri di carbone nel polmone delle cavie non hanno esercitato alcuna azione sulla virulenza nè sullo sviluppo del bacillo della tubercolosi, poichè questo ha condotto a morte gli animali.* Anzi in qualche caso il polmone era così disseminato di tubercoli, come raramente avviene di osservare: e per giunta, in un caso, questi tubercoli erano così ricchi di bacilli da sembrare i preparati come provenienti da cultura pura. I bacilli erano inoltre sempre virulentissimi; giacchè innesti di tubercoli fatti, a scopo diagnostico, in altre cavie, ne' produssero più o meno rapidamente la morte.

Risultati simili, ma per metodi d'indagine non esenti di critica. hanno avuto anche il Jousset, e, prima di lui, il Claissè e Josuè. quantunque questi ultimi abbiano agito in condizioni differenti dalle mie, studiando essi in special modo l'evoluzione dei corpuscoli di nerofumo nei tessuti polmonari. Anzi, appunto per aver prodotta l'antracosi col fumo di una lampada a trementina, subirono la giusta critica del Vallin, di non essersi posti nelle condizioni naturali, non avendo essi fatto inalare particelle di carbone tali come si trovano nelle miniere, nelle carbonaie, e venendo così a produrre nei loro animali tutt'al più un semplice *tatuage* sperimentale dei polmoni.

A conferma poi di questi risultati sperimentali sta anche il fatto riscontrato dal Lanceraux in una stalla di buoi situata presso una fabbrica, dalla quale si svolgeva una grande quantità di polvere di carbone. Egli vide che tali animali affetti quasi tutti di tubercolosi polmonare avevano i polmoni fortemente antracotici.

***

Riassumendo si ha che:

α) la polvere di carbone (minerale vergine, coke, e vegetale) non è dotata di alcun potere antisettico e tanto meno disinfettante;

β) la polvere di carbone dei depositi è ricchissima di microrganismi, fra i quali notati anche dei piogeni;

γ) anche nell'interno dei grossi pezzi di carbone, di qualunque delle tre specie predette, si trovano microrganismi, certamente penetrativi dall'esterno nel senso delle stratificazioni del carbone;

δ) l'aria dei depositi di carbone è ricca di microrganismi, fra i quali notati anche dei piogeni;

ε) nei polmoni fortemente antracotici di cavie sottoposte, per la durata di oltre due mesi, all'inalazione di polvere di carbone, il bacillo di Koch si sviluppa attivamente, e si hanno forme gravissime di tubercolosi polmonare.

È da escludersi, quindi, che, per qualsiasi ragione, la polvere di carbone esplichi un'azione antitubercolare; la qual cosa, del resto, viene anche dimostrata dallo stesso fatto statistico, su cui si è basata quella che io non esito a chiamare la *leggenda della relativa immunità per la tubercolosi di coloro che respirano aria ricca di tale polvere*. Infatti, se, giusta i dati dell'Hirt, la mortalità per tubercolosi fra i minatori di carbone è di 1.3 su 100 malati per ogni malattia; e se, secondo quelli di Schlockow, dell'Ogle e dello Zeitlmann, innanzi riferiti, la mortalità per tubercolosi va per lo più dall'1.66 al 7.25, e sale anche fino al 30.9 su 1000 individui esposti all'inspirazione di polvere di carbone; tutto ciò vuol dire che in essi, in sostanza, attecchisce e si sviluppa il bacillo di Koch, e che, come dall'esperimento risulta, non vi è antagonismo, per qualsiasi ragione, fra antracosi e tubercolosi polmonare. E ciò tanto più quando si riflette che, anche nelle nazioni dalla tubercolosi più afflitte, la mortalità per *tutte* le forme di essa, non supera, *nella popolazione in genere*, il 4 per 1000.

È vero che, nelle statistiche innanzi riferite, la mortalità per tubercolosi è in genere alquanto inferiore fra i minatori di carbone che non fra gli altri operai; ma se specialmente ben si osservano i dati dello Schlockow, si vede che essi variano nei diversi luoghi e, ripeto, giunge in qualche località fino al 30.9 per 1000, vale a dire ad una mortalità fra le più alte per tale infezione.

Il che dà ragione di credere, che dove la mortalità per tubercolosi è scarsa, ben altra deve esserne la causa, che non l'invocata

respirazione e la presenza di polvere di carbone nei polmoni. E ciò maggiormente verrebbe messo in chiaro se, non tenendo presente soltanto i dati statistici riguardanti i *minatori*, si potessero avere dati esatti anche per ogni altra categoria d'operai che all'industria del carbone o a mestieri ricchi di polvere di carbone sieno addetti. Questi dati, purtroppo, mancano, nè a me è riuscito, per una complicata serie di difficoltà, di poterli avere, per quanto ne avessi fatta ricerca, per esempio, presso Società di mutuo soccorso fra gli scaricatori di carbone nei porti. In ogni modo, a maggiormente dimostrare che ben altra deve essere la ragione della scarsa mortalità notata fra i minatori di carbone in alcuni luoghi, sta anche il fatto che, se, per i dati dello Zeitlmann innanzi riferiti, i macchinisti e fuochisti (che all'inspirazione della polvere di carbone sono più esposti) presentano, di fronte ai conduttori, una mortalità per tubercolosi alquanto minore, ciò non si avvera nella Rete Adriatica delle ferrovie italiane. Infatti da una statistica molto accurata raccolta nel decennio 1894-1903 e fornitami con molta cortesia (di cui pubblicamente lo ringrazio) dal dott. Ricchi, che con tanto valore e zelo dirige il servizio sanitario di tale rete, ho potuto ricavare questi dati medii riguardanti la mortalità per tubercolosi su 1000 ferrovieri di ciascuna categoria.

CATEGORIA DEL PERSONALE	Media decennale 1894-1903		
	del personale	dei casi di tubercolosi	mortalità ‰ per tubercolosi
Trazione (*macchinisti e fuochisti*)	4,782	15	3. 13
Movimento (*personale viaggiante e di stazione*)	11,213	35. 5	3 16
Materiale mobile (*officine*)	3,783	7. 4	1. 95
Manutenzione	11,151	22. 6	2. 02
Magazzini.	826	3 3	3. 99

Da questa tabella, dunque, si rileva che, contrariamente ai dati dello Zeitlmann per le ferrovie tedesche, la mortalità per tubercolosi non è, nella rete Adriatica, minore fra macchinisti e fuochisti (*personale di trazione*) che fra i conduttori (*personale di movimento*), non potendo essere presa in alcuna considerazione la minima differenza di appena *tre centesimi*.

Io credo che il riscontrare di frequente una minore mortalità per tubercolosi fra i minatori di carbone e coloro che sono addetti a mestieri ricchi di polvere di carboni, dipende specialmente da due fatti. Dal fatto, cioè, che individui deboli e disposti a malattie dell'apparecchio respiratorio sono tenuti lontani da tali mestieri per se stessi faticosi; quindi una selezione di individui alla tubercolosi meno disposti. E dall'altro fatto che, pel modo come si ottiene e pei luoghi dove si maneggia e si conserva il carbone, e pel tenersi lontano da essi gli individui in stadio già avanzato di tisi polmonare, difficilmente può capitare nella polvere di carbone il bacillo della tubercolosi.

E ciò viene anche dimostrato dal fatto, che, secondo le osservazioni del Trotter innanzi riferite, la mortalità per tubercolosi è maggiore fra le donne dei suoi minatori che fra questi; le quali donne (a differenza dei loro uomini, viventi gran parte della giornata nelle miniere e fuori dalle loro malsane abitazioni) passano molto maggior tempo agglomerate in case umide e mal ventilate, e sono esposte molto più facilmente ad inalazioni di polveri inquinate di bacilli tubercolari. Altri individui, inoltre, come per esempio i macchinisti ed i fuochisti delle ferrovie, che a differenza dei minatori, pur respirando molta polvere di carbone, si trovano più facilmente esposti a cause di contagio, non giustificano con la loro mortalità per tubercolosi quella che io ho chiamato la *leggenda della minore disposizione dei carbonai a tale malattia.*

BIBLIOGRAFIA.

Albrecht H. Handbuch der Praktischen Gewerbehygiene. Berlin, 1896.

Arnold. *Untersuchungen über Staubinhalation und Staubmetastase.* Leipzig, 1885.

Beleites. *Zur Kenntniss der Lungen anthracosis.* Jahresbericht der Kgl. preussichen Bergbehorden, 1889.

Buchner. *Untersunchungen über den Durchtritt von Infectionserregern durch die intacte Lungenoberfläche.* Archiv für Hygiene, Band 8.

Binz. *Lezioni di farmacologia.* — Napoli, 1888.

Carrien. *De la pneumoconiosi antracosique.* Archiv de phisiolog. norm. et phathol. 4 ser. VII, 1879.

Clifford. *Phthisis in coal miners.* The Lancet, London, 1894.

Claissè et Josuè. *Les pneumoconioses.* Bulletin de l'Académie de médecine, 1897, et Revue d'Hygiène et P. S., 1897.

Fabre P. *De l' état sanitaire des mineurs de nos jours.* Gaz. médicale de Paris, 1881.

Franz K. *Das Verhalten der Bergleute in den Steinkohlengruben zu Brustkrankheiten.* Wiener medizin. Presse, 1879.

HIRT. *Die Staubinhalationskrankheiten. Die Krankheiten der Arbeiter.* Breslau, 1871.

HALL. *The so-called anthracosis and phthisis in coal miners.* The British Medical Journal, 1903.

IOSSET. *Rareté de la tubercolose chez les mineurs de houille.* Revue d'Hygiène et P. S., 1898.

IDEL. *Ueber einen Fall von geheilter Lungentuberkulose und deren Beziehungen zur Pigmentinduration.* Inaugural dissertation. Wurtzburg, 1889.

ISENBERG. *De l'hygiène du houilleur et des maladies, qui lui sont particulières.* Montpellier, 1897. Riferito nella Hygienische Rundschau, 1897.

LANCERAUX. *De l'anthracose pulmonaire chez les polisseurs de charbons électriques.* Bulletin de l'Académie de médecine, 1893.

LÖFFLER. *Bericht über der Congress zur Bekämpfung der Tuberkulose.* Berlin, 1899.

MERKEL. *Delle malattie professionali.* Trattato di patologia e terapia spec. medica dello Zeimssen, vol. 1°, parte 3ª. Napoli, 1892.

OLIVER. *Discussion on Miners Phthisis.* The British Medical Journal, 1904.

OGLE-SEBENTH. International Congress of Hygiene and Demography. London, 1891, vol. X.

PAPASOTIRIU. *Ueber der Einfluss der Kohle auf der Tuberkelbacillus.* Münchener Medicinische Woschenschrift, 1901.

PURDY. *The so-called anthracosis and phthisis in coal miners.* The British Medical Journal, 1903.

RICHARD. *Anthracose pulmonaire.* Revue d'Hygiène et P. S., 1888.

RACINE. *Ueber das Verhältnis von Emphysem und Tuberculose zur Kohlenlunge der Bergleute.* Vierteljahrsschrift für geritchl. Med. und öff. Sanitätwesen, 1884.

RUPPERT. *Experimentelle Untersuchungen über Kohlenstaubinhalationen.* Archiv Virch., 1878.

SELTMANN. *Die Anthrakosis der Lungen bei den Kohlenarbeitern.* Deutsches Archiv f. Klin. Medic., V. II del 1866.

SCHLOCKOW. *Die Gesundheitspflege und medicinische Statistik beim preussischen Bergbau.* Berlin, 1881.

SENFT. *Der Schlesische Steinkohlenbergbau in sanitäts-polizeilisches Beziehung.* Wiener mediz. Presse, 1879.

SOULIER. *Trattato di terapeutica e farmacologia*, trad., v. I, Milano, 1903.

TROTTER. *The so-called anthracosis and phthisis in coal miners.* The British Medical Journal, 1903.

TAMBURINI. *Trattato di terapeutica e materia medica.* Milano, 1899.

TRIPIER. *Contribution à l'étude de la tuberculose pulmonaire anthracosique.* Lyon, 1903. Riferito dal The British Medical Journal, 1903.

UNDERHILL. *Carbonaceous infarction of colliers lungs.* Dublin, Journal of Medical, 1877.

VILLARET. *Gesundheitschädigende Einflüsse beim Gewerbebetriebe.* Dall'Handbuch der Praktischen Gewerbehygiene dell'Albrecht. Berlin, 1896.

WALSCHE. *Traité clinique des mal. de la poitrine.* Paris, 1860.

ZEITLMANN. *Morbiditätsstatistik der deutschen Eisenbahnverwaltungen.* München, 1901.

Istituto di Anatomia patologica dell'Università di Pisa

Della vaccinazione antitubercolare nei bovini - Ricerche sperimentali sui bacilli della tubercolosi umana, bovina e aviaria.

Relazione alla Facoltà medica dell' Università di Pisa

pel dott. **ALBERTO PEPERE**
aiuto e libero docente di Anatomia patologica.

Ho creduto mio stretto dovere render noti i risultati di quelle ricerche sperimentali sulla tubercolosi umana e bovina iniziate dal mio Maestro prof. Maffucci e che questa onorevole Facoltà medica di Pisa alla morte di Lui volle affidarmi per mandarle a termine (1). M'è doveroso ancora esprimere la mia gratitudine ai singoli membri della Facoltà ed in special modo al Rettore prof. comm. Supino per l'opera spiegata in mio favore, che tendeva a che non mi venissero sottratti i mezzi necessari all'adempimento del mio mandato. Un complesso di circostanze, che è inutile qui riferire, resero in gran parte vani i tentativi a questo scopo sperimentati; cosicchè queste ricerche che avevano avuto in principio la fortuna di interessamenti molteplici e generosi, non conservarono più tardi la stessa buona sorte. Dico ciò solo per giustificarmi in parte delle restrizioni e delle modificazioni che ho dovuto apportare al largo disegno sperimentale ideato dal Maffucci, per necessità non prevedibili al tempo in cui accettai il lusinghiero ed onorifico incarico, che accolsi come mio doveroso tributo di affettuosa e profonda riconoscenza alla memoria cara e venerata del Maestro.

A migliore intelligenza dei fatti, io riporto succintamente i risultati parziali a cui era giunto il Maffucci, risultati che furono da lui

(1) Verbali delle Sedute di Facoltà, 3 decembre 1903.

pubblicati qualche mese prima della sua morte (*La Clinica Moderna*, IX, n. 34), credendo inutile rifarmi dalle sue premesse, che in tal genere di studi rimontano ormai invariabilmente alla ben nota comunicazione di Koch (Congresso di Londra, 1901) sulla netta dualità della tubercolosi umana e della tubercolosi bovina.

Ecco in succinto gli esperimenti e le conclusioni del Maffucci. Egli aveva trattato un 1° gruppo di quattro vitelle (A, B, C, E) con innesti sottocutanei di materiale tubercolare umano, proveniente direttamente dal cadavere: passata, dopo mesi, la reazione locale e generale, gli animali, negativi alla tubercolina, accresciuti in peso e in nutrizione, furono sottoposti ad iniezione intravenosa, o ancora sottocutanea, di masse bacillari di tubercolosi umana in dosi progressivamente crescenti (40-500 mgr.) provenienti da culture virulenti e che non avevano subìto alcuna attenuazione artificiale. Una vitella (E), uccisa in questo periodo, mostrò che i focolai antichi d'innesto erano affatto sterili; non lo era l'ultimo (sottocutaneo, datante da soli 15 giorni), nel quale v'erano sempre bacilli vivi e virulenti: degli organi interni il solo polmone presentava tubercoli miliari grigi sottopleurici, piccolissimi e recenti, in rapporto evidente con l'ultima iniezione endovenosa che rimontava a 50 giorni: nessuna traccia che indicasse le pregresse infezioni, che erano state complessivamente quattro. Questo reperto da un lato conferma quanto il Maffucci aveva in più riprese dimostrato, che cioè gli animali refrattari alla tubercolosi perchè possano sbarazzarsi del bacillo è necessario che presentino la formazione del tubercolo, il quale più tardi regredisce e scompare affatto; d'altra parte ci spiega ancora la disparità di opinioni sulla possibilità da parte dei bovini di assumere la tubercolosi umana, giacchè gli animali uccisi poco tempo dopo l'inoculazione di culture di tubercolosi umana apparivano tubercolosi, mentre non lo sarebbero stati più in un tempo ulteriore.

A conferma di ciò un'altra vitella (F) era già stata iniettata per la via venosa con 46 mgr. di massa bacillare virulenta dell'uomo. Dopo otto mesi l'animale, che già non aveva più dato reazione alla tubercolina, fu ucciso e non presentò nessuna lesione di natura tubercolare nei visceri interni e neppure traccia di lesioni guarite: solo nel punto ove era stata fatta l'iniezione, intorno alla giugulare, esisteva un ascesso incapsulato, non più grosso di una nocciuola, con contenuto caseoso e numerosi bacilli tubercolari granulosi che si poterono coltivare e che dettero tubercolosi nelle cavie.

Tre nuove vitelle (2° gruppo) furono trattate con tubercolosi bovina; una (D) con innesto sottocute di organi emulsionati di cavia

innestata con noduli fibrosi di tubercolosi perlacea proveniente da da questi macelli. Fu ucciso l'animale dopo 10 mesi, in condizioni che lasciavano prevedere ancora soli pochi giorni di vita, e fu trovato in preda a processo tubercolare progressivo di tutti gli organi. Una seconda vitella (G) fu trattata prima con iniezione sottocutanea e nello stesso tempo endovenosa di materiale caseoso tubercolare bovino finemente emulsionato (che si mostrò di poco potere vegetativo sui sustrati nutrizî, ma discretamente virulento per le cavie) e più tardi, dopo un anno, quando le condizioni generali dell'animale risorsero, con 46 mgr. di massa bacillare tubercolare bovina virulenta sotto la cute. La terza vitella (O) fu sottoposta all'infezione tubercolare bovina per la via delle vene con 34 mgr. di massa bacillare virulenta: essa morì dopo tre mesi di tubercolosi generalizzata.

Il 3° gruppo è formato di un'unica vitella (H) con innesto per le vene (30 mgr.) e sottocute (20 mgr.) di tubercolosi aviaria; restò sempre profondamente marantica ed uccisa dopo 8 mesi non si trovarono lesioni tubercolari nei visceri; frammenti di organi passati in polli e in cavie non dettero tubercolosi; solo qualche cavia morì di marasma.

Le prove di vaccinazione tentate dal Maffucci riguardano tre vitelle del 1° gruppo (A, B, C), trattate per via sottocutanea e per via venosa con dosi progressivamente crescenti di tubercolosi umana virulenta: dopo un tempo variabile da uno a due mesi dall'ultima iniezione, presumibilmente guarita, ricevettero nelle vene un'emulsione di bacilli di tubercolosi bovina virulenta in dose proporzionale al peso di ciascuna (57-63 mmgr.) rispetto alla dose iniettata precedentemente nel vitello *O*, morto in tre mesi di tubercolosi bovina. Una delle vitelle (A) presentò tutto il quadro clinico della tubercolosi bovina sperimentale e fu uccisa in stato agonico dopo circa tre mesi; l'autopsia mostrò una tubercolosi generalizzata a tutti i visceri. Era questo l'animale che aveva ricevuto una maggior quantità di tubercolosi umana (940 mgr.); da ciò il Maffucci fu indotto a credere ad una ipersensibilità della vitella, acquisita durante la vaccinazione, come può accadere anche nella vaccinazione contro infezioni acute: in altri termini questa vitella ipervaccinata contro i bacilli della tubercolosi bovina, sarebbe soccombuta a questa stessa infezione per l'acquisita ipersensibilità durante l'immunizzazione. Le altre due vitelle, dopo un breve periodo di rialzo termico (40. 5-41. 8) e di abbassamento di peso, ritornarono in condizioni normali, crebbero straordinariamente di peso, non dettero più reazione alla tubercolina, e più tardi furono entrambe saltate dal toro.

Fin qui il Maffucci con le conclusioni (riporto solo le più importanti) che *il bacillo della tubercolosi umana determina nei bovini una lesione transitoria che guarisce;* che *è possibile indurre nei bovini una refrattarietà verso la tubercolosi perlacea se essi vengono preventivamente trattati con culture virulente di tubercolosi umana ;* che *i bovini mentre sono capaci d'abituarsi alle forti dosi di bacilli virulenti della tubercolosi umana, sono meno resistenti a quelli della tubercolosi di pollo che si mostra fortemente tossica per essi ;* che *il bacillo della tubercolosi umana può restar vivo nei tessuti del vitello se l'ascesso che si forma viene incapsulato.*

***

A me restavano così tre gruppi di animali. Nel 1° due vitelle vaccinate (B, C), di cui una gravida (B): nel 2° una vitella (G) trattata in primo tempo con tubercolosi bovina attenuata sottocute e in secondo con bacilli di tubercolosi bovina virulenta anche sottocute; quelle e questa in apparente perfetta salute: nel 3° gruppo tre vitelle (I, L, N) in preparazione per esser vaccinate e infine un'ultima vitella (M) sana, che era servita fin qui di controllo per l'accrescimento in peso degli altri animali.

Continuare sull'indirizzo che il Maffucci vagheggiava di portare nelle sue ricerche, che avrebbero dovuto aver di mira, una volta stabilita la vaccinazione antitubercolare dei bovini, il passaggio dell'immunità ai figli, le qualità immunizzanti migliori per questi se provenienti dal padre o dalla madre o da entrambi i genitori, la maggiore o minore refrattarietà dei figli rispetto all'epoca più vicina o lontana della refrattarietà conquistata dai genitori, e altri problemi della più alta portata scientifica ed economica, mi era impossibile con questo materiale sperimentale molto ridotto e che la già lamentata scarsezza di mezzi non mi permetteva di aumentare. Era necessario adattare e modificare gli esperimenti: e perciò lasciando un po' da parte la via indicata dal Maffucci mi son limitato a definire quelli che con maggiore probabilità potevo nel miglior modo portare a termine.

***

Precedentemente s'era ottenuta sempre la preparazione dei vitelli con dosi di tubercolosi umana assai più alte e molto più virulente di quelle tentate da altri sperimentatori da Koch e Behring in poi. Io ho cercato di variare le proporzioni e la qualità del materiale d'innesto nei tre vitelli del mio 3° gruppo.

In uno (L) che aveva già avuto 100 mgr. di cultura pura e virulenta di tubercolosi umana sottocute e più tardi 100 mgr. nella giugulare (1), tentai le dosi massime per la via delle vene, per stabilire fino a qual punto i bovini resistono a questa specie d'infezione e se veramente questo terreno così preparato non fosse più adatto alla vaccinazione: esso ebbe così 1500 mgr. di bacilli virulenti in più volte nello spazio di otto mesi, e provenienti da una mescolanza di 8 specie diverse di bacilli umani. Nel punto del primo innesto s'era già formato un ascesso che era stato aperto e vi si trovarono dopo 4 mesi bacilli tubercolari vivi e virulenti. Residuò ancora un ingorgo notevole della parte.

Nel secondo (N) iniettai alternativamente nelle vene e sottocute dosi piccolissime di tubercolosi umana attenuata col calore e col disseccamento (2): fatta astrazione di una prima iniezione di 50 mgr. che l'animale aveva subito dieci mesi prima e di cui era già rapidamente e completamente guarito (come lo dimostrava anche la sua grande vivacità), esso ebbe 14 mgr. di bacilli. Nel corso del trattamento soffrì di una dermatite molesta a cui si aggiunse uno scolo di sostanza purisimile dalle orecchie: dopo alcuni mesi ne guarì.

La terza vitella (I) aveva avuto con iniezione sottocutanea 60 cc. di un'emulsione di glandole linfatiche di una giovinetta morta con tubercolosi glandulare linfatica generalizzata e peribronchite tubercolare: l'esame batterioscopico mostrò che i bacilli di Koch nelle glandole erano assai scarsi, e pochi perciò, nonostante la grande diluizione dell'emulsione, ne erano stati iniettati alla vitella: essa non ebbe reazione febbrile malgrado l'ingorgo formatosi nel punto d'innesto che rapidamente fu riassorbito: dopo oltre i due mesi non dava più reazione alla tubercolina e cresceva in nutrizione. Sedici mesi dopo l'animale era in ottimo stato di salute e cominciai a trattarlo con piccole dosi di tubercolosi aviaria (6 mgr.) nelle vene: nello spazio di 3 mesi ebbe così 18 mgr. di massa bacillare virulenta pei polli che volta a volta venivano innestati per controllo.

Il comportamento di questi animali differì sensibilmente. Nella vitella L, trattata con dosi massime di tubercolosi umana, la reazione ad

---

(1) Nella pubblicazione del Maffucci (l. c.) appare per errore che la vitella L abbia avuto solo 100 mgr. sottocute, mentre gli altri 100 mgr. iniettati nelle vene apparirebbero nella vitella I, che in realtà non aveva avuto che il solo innesto di materiale cadaverico, come è detto dopo.

(2) L'attenuazione delle culture innestate fu provata sulle cavie: la stessa quantità di massa bacillare emulsionata capace di uccidere le cavie in 25-30 giorni, dopo l'attenuazione artificiale subita ammazzò tre animali solo dopo 95-107-130 giorni, e i due ultimi con tubercolosi delle sole ghiandole linfatiche.

ogni singola iniezione si faceva ogni volta progressivamente più rapida, ma sempre meno vivace, così che alle ultime la reazione febbrile era divenuta quasi nulla: dopo un certo tempo dal trattamento la prova della tubercolina restava negativa. Più tardi però l'animale ebbe diarree profuse e temperature abbastanza alte (40.5) e irregolari: si sospesero le iniezioni e fu tenuto in osservazione. Dopo 5 mesi la vitella era nuovamente in condizioni di salute apparentemente ottime e le furono innestate sotto la cute (piega dell'inguine) 12 mgr. di tubercolosi bovina, una terza parte cioè della quantità che nelle vene del vitello O aveva prodotto la morte in tre mesi, e circa la quinta parte di quella iniettata nelle vene alle vitelle vaccinate A, B, C. Ebbe subito febbre assai alta che si mantenne tale per 22 giorni con diminuzione del peso: scomparsa la febbre l'animale ritornò in buone condizioni: dopo 3 mesi era già negativo alla tubercolina, sebbene persistesse l'ingorgo pastoso nel punto del primo innesto.

Il vitello N iniettato con dosi minime e poco virulente si manteneva così vivace che fu castrato: esso dette ogni volta dopo l'iniezione reazione immediata (4-7 ore dopo) con febbre che durava 12-24 ore, ma di poca entità: fu innestato più tardi con tubercolosi bovina (25 mgr.) nelle vene, alla quale reagì con febbre alta (41. 6) nella giornata stessa e che continuò per sette giorni, dopo dei quali la temperatura ritornò normale: dopo due mesi non dette reazione alla tubercolina.

La vitella I durante il trattamento con tubercolina aviaria si condusse in modo assai diverso della vitella H del Maffucci: difatti essa sopportò benissimo le piccole dosi iniettate, con lieve rialzo termico di breve durata ad ogni intervento. Dopo l'innesto nelle vene di 25 mgr. di tubercolosi bovina ebbe reazione febbrile per la durata di 8 giorni con lieve decadimento della nutrizione: saggiata dopo due mesi con la tubercolina restò negativa e l'accrescimento in peso era già considerevole.

La vitella G del 2° gruppo doveva credersi vaccinata anch'essa, giacchè dopo la prima iniezione sottocute di materiale tubercolare bovino manifestamente attenuato, la iniezione sottocutanea di bacilli della tubercolosi bovina virulenta, che in proporzione assai minore rispetto al peso aveva ucciso in tre mesi la vitella O, aveva procurato ad essa solo disturbi passeggeri. In questo animale, in altri termini, la refrattarietà alla tubercolosi bovina non fu provocata come nelle altre con tubercolosi umana, ma con la stessa tubercolosi bovina attenuata e con una unica iniezione di questa.

Aggiungo incidentalmente che tentai le proprietà del siero di questi diversi animali immunizzati sui conigli e sulle cavie, ma con risultati

affatto negativi così dal lato immunizzante, come da quello curativo. Su ciò è inutile che io mi fermi essendo il fatto confermato già da altri osservatori ed anche recentemente da Baumgarten ed Hegler (1) e da Rappin e Blaizot, che avevano seguito la stessa tecnica di Behring per la vaccinazione dei bovini.

***

Fino a questo momento tutti gli animali erano stati a volta a volta saggiati con tubercolina pura dell'Istituto sieroterapico milanese diluita in acqua fenica (0. 5 %).

Volli provare quali risultati poteva dare, rispetto a questo tipo di tubercolina, quella preparata con bacilli della tubercolosi bovina e quella preparata con bacilli della tubercolosi aviaria: a modo di controllo preparai ancora una tubercolina umana, che mi rispose agli effetti allo stesso modo che la tubercolina di Milano già usata. I risultati della tubercolina aviaria furono presso a poco gli stessi della tubercolina umana; e dico così perchè gli animali restati negativi a questa, lo furono anche a quella: non posso però dire se in sostanza la tubercolina aviaria abbia un'azione meno energica di quella umana. Al contrario la tubercolina preparata con bacilli della tubercolosi bovina si mostrò, fin dalle prime prove, dotata di un'azione assai più alta di quella umana. Provata dapprima negli animali che erano in preparazione vaccinica, nella stessa proporzione e anche in quantità inferiore (2/3), produceva una reazione sensibile e più rapida di 1-1 $^{1}/_{2}$ grado, mentre quella umana era già restata senza effetto 40 giorni innanzi. Ma ciò che è più interessante ancora è che mentre le vitelle vaccinate C e G e in apparente perfetta salute non rispondevano affatto alla tubercolina umana, furono sensibili (1°-1°, 2) alla tubercolina bovina sei mesi dopo la creduta acquisita vaccinazione. Dirò in più che a parità di condizioni la tubercolina bovina da me preparata, amministrata per il sottocutaneo, era sempre più attiva della tubercolina umana iniettata per le vene (Kitt e Malm).

Questi risultati, che già in parte aveva ottenuto Kanda, vanno presi in seria considerazione nella pratica, giacchè è manifesto, come si vedrà in seguito, che la tubercolina preparata con bacilli della tubercolosi umana non è sempre sufficiente a svelare il processo tubercolare che si rende clinicamente manifesto con la tubercolina bovina.

---

(1) Da qualche mese (vedi in seguito) Baumgarten ed Hegler hanno annunziato d'aver ottenuto un siero di effetto preventivo pel bovino.

E questi risultati hanno in certo modo riscontro in altre mie esperienze comparative in corso sui prodotti tossici dei diversi tipi di bacilli tubercolari, considerati non soltanto secondo la loro provenienza (umana, bovina, aviaria), ma ancora secondo i diversi loro periodi di stato saprofitico sui sustrati nutrizî: i tossici tubercolari dei bacilli bovini hanno azione di gran lunga maggiore che non quelli provenienti da bacilli tubercolari umani.

***

La gravidanza della vitella vaccinata B procedè normalmente nei primi mesi: dal settimo in poi le condizioni nutritive dell'animale cominciarono rapidamente a decrescere e negli ultimi periodi divennero meschinissime. Il parto fu normale; il vitello nato pesava kg. 108 e saggiato con tubercolina bovina non dette reazione. Durante il puerperio l'animale ebbe un processo infiammatorio dei genitali esterni, con scolo fetido dalla vagina, di cui guarì lentamente. La quantità di latte nei primi giorni appena sufficiente ai bisogni del vitellino, decrebbe rapidamente, così che per un po' di tempo bisognò sopperirvi con l'allattamento artificiale. Nel latte provato con la centrifugazione e con l'innesto alle cavie non esistevano bacilli tubercolari, ma l'animale reagiva alla tubercolina. Due mesi dopo il parto, rifiutando il cibo e fortemente denutrito, è ucciso e si trova con estesa tubercolosi del polmone a grossi noduli caseificati confluenti, alcuni pochi allo stato fibroso; scarsi noduli più piccoli, dello stesso aspetto, erano sparsi negli altri visceri; le mammelle erano apparentemente e istologicamente sane.

Questo animale moriva a distanza di circa 14 mesi dal trattamento con tubercolosi bovina e le culture ricavate dalle cavie innestate con frammenti di organi e dagli organi stessi dettero sviluppo a colonie con aspetto di tubercolosi bovina.

Dato questo reperto in un animale che per un anno intero era stato creduto vaccinato, mi parve necessario vedere in quali condizioni anatomiche si trovasse l'altra vitella (C) trattata di pari passo con questo. Essa era stata negativa alla tubercolina umana e per due volte saggiata negli ultimi tempi con tubercolina bovina aveva dato reazione dubbia (0,5-0,9); per misure di prudenza non avevo voluto spingere più oltre le dosi di tubercolina, nè tentare in questo animale la via venosa. Anche in questa seconda vitella esisteva un processo tubercolare, circoscritto però ai soli polmoni e alle glandole linfatiche peribronchiali coi caratteri di tubercolosi perlacea, forma fibrosa, a progresso estremamente lento.

A stabilire se l'infezione di tubercolosi bovina s'iniziasse subito dopo l'iniezione di bacilli tubercolari bovini o se il trattamento preventivo con tubercolosi umana rendesse per lo meno più difficile l'attecchimento di quelli, ho sacrificato la vitella L che avevo preventivamente trattata con alte dosi di tubercolosi umana, e che da tre mesi e mezzo soltanto era stata infettata con scarsissime quantità (12 mgr.) di tubercolosi bovina: nel punto dell'ultimo innesto non s'era avuto che un po' di durezza dei tessuti che presto scomparve. All'autopsia nessuna traccia di noduli tubercolari antichi o recenti, tranne che un piccolo ascesso sottocutaneo grosso come una nocciuola, incapsulato da denso e spesso tessuto fibroso, con contenuto cremoso, in cui esistevano pochi bacilli vivi e ancora discretamente virulenti per le cavie, localizzato nel primo punto d'inoculazione della tubercolosi umana, ascesso che formatosi da tempo e già inciso una volta si riduceva con estrema lentezza. L'innesto nelle cavie di frammenti di polmone, di fegato, di rene, di ghiandole linfatiche di vari distretti, rimase senza effetto: però una cavia su tre innestate con milza e con midollo osseo ed una innestata con pezzetti di ghiandole prelombari morirono di tubercolosi: notevole il fatto che piccoli pezzi di tessuto dell'ultimo punto di innesto restarono negativi nelle cavie.

Questo risultato mi sembra importante per diversi fatti.

Anzitutto esso ci dimostra a quali enormi dosi di tubercolosi umana virulenta resistano i bovini con disturbi passeggeri a carico della nutrizione, di cui presto guariscono.

In secondo luogo ci confermano un reperto già ottenuto dalla vitella F, che cioè i bacilli della tubercolosi umana possono persistere conservando la loro virulenza per un tempo assai lungo (8 mesi, F - 18 mesi, L) incapsulati nei tessuti dei bovini, ciò che nella tecnica di immunizzazione dev'essere preso in seria considerazione.

Ma più interessante è la dimostrazione palese di ciò che accade negli animali quando in seguito al trattamento con tubercolosi umana viene ad essi innestata la tubercolosi bovina, fatto che già il risultato degli esperimenti precedenti faceva prevedere. Dopo tre mesi e mezzo i bacilli della tubercolosi bovina in questa vitella non erano stati ancora distrutti, sebbene iniettati sottocute in piccola dose e già scomparsi dal punto d'innesto; ma si trovavano annidati, dirò allo stato latente, nella milza, nel midollo osseo e in alcuni gruppi di glandole linfatiche, pronti certamente ad esplodere al primo annunzio d'un abbassamento dei poteri fisiologici dell'animale ospite: così nella vitella B era bastata la gestazione, il travaglio del parto, l'allattamento per snidarli ed erompere nella più conclamata delle tubercolosi bovine:

all'opposto il loro progressivo sviluppo nella vitella C era ostacolato dalle buone condizioni di salute dell'animale. Pensare che i bacilli esistenti ancora nella milza, ecc., fossero in via di distruzione e che forse non se ne sarebbe avuto più traccia se l'animale fosse vissuto per parecchio tempo ancora in buone condizioni, mi pare che sia in contraddizione con i reperti precedenti.

In ultimo è da rilevare anche che dietro un tal reperto anatomico e riferendoci anche ai risultati ultimi fornitici dagli altri animali precedentemente uccisi, bisogna concludere che anche con dosi così esagerate di tubercolosi umana non s'era creato nell'animale quello stato di ipersuscettibilità verso l'infezione posteriore bovina, che ricordano diversi sperimentatori (Schlegel, Hutyra, Maffucci): probabilmente i limiti di tolleranza di processi reattivi così delicati più che dal metodo dipendono forse da qualità individuali.

***

Se in complesso questi risultati sembrano a tutta prima in contraddizione con quanto, riportandosi anche ad esperienze di altri osservatori (Behring, Thomassen, Pearson), il Maffucci asseriva, che cioè le culture virulente di tubercolosi umana conferiscono ai bovini una refrattarietà alla tubercolosi loro propria, non lo sono poi di fatto. perchè il Maffucci stesso si domandava quanto tempo possa durare questa proprietà immunizzante. Che i vitelli preparati resistano alla infezione tubercolare bovina meglio che i controlli, è ben chiaro se si considerano il decorso clinico e il reperto necroscopico delle vitelle B, C ed L in confronto a quelli delle vitelle D ed O: però questa immunità, se pure di una vera immunità può parlarsi, ha carattere transitorio di assai breve durata.

Se ciò veramente sia dipeso dalla quantità di tubercolosi umana iniettata nei nostri animali per creare in essi un sustrato vaccinico, lo si può forse sospettare ma non dimostrare, giacchè risultati molto migliori io non ho ottenuto neppure con l'innesto preparatorio di quantità assai piccole di bacilli. Il vitello N corrispondeva a questi dati e sebbene durante la preparazione si fosse trovato in condizioni nutritive scadenti per una dermatite di dubbia natura a cui si complicò uno scolo purulento dagli orecchi e dagli occhi (niente affatto in rapporto con la infezione sperimentale), era già guarito quando, cessato il trattamento preventivo, gli si inocularono nelle vene i bacilli di tubercolosi bovina.

Fu ucciso dopo 6 mesi, nel qual tempo due volte sole aveva dato

reazione alla tubercolina in principio, poi fu negativo, ma rispose positivamente un'altra volta prima che fosse macellato. Nel polmone vi erano pochi ma grossi noduli tubercolari caseosi e noduli più piccoli grigi e giallastri nella pleura e nel peritoneo: grosse e caseose erano le ghiandole peribronchiali e tracheali e una circoscritta localizzazione tubercolare s'era prodotta fra i tessuti di cicatrice residuati alla castrazione.

Che anche in questo vitello sia mancato il conseguimento della vaccinazione, è forse dipeso o dal fatto che le dosi di tubercolosi umana furono insufficienti ad ottenerla rispetto alla quantità di tubercolosi bovina iniettata, o che le condizioni di salute del vitello durante la preparazione non gli abbiano permesso di produrre tutti i suoi poteri vaccinanti; ma ciò non può affermarsi con certezza in un senso o nell'altro, tenendo conto da un lato delle dosi di cui si servirono altri sperimentatori, dall'altro che l'animale era già guarito dalla sua malattia intercorrente e non dava più reazione alla tubercolina prima che fosse trattato con tubercolosi bovina. Con più ragione forse è a domandarsi se il processo tubercolare in atto trovato all'autopsia fosse in via regressiva piuttosto che progressiva: ma dall'aspetto delle lesioni e dai dati comparativi che mi fornivano gli organi di altre vitelle precedentemente macellate, io non ho alcun dubbio a sostenere che la tubercolosi lentamente progredisse allo stesso modo all'incirca che nella vitella C.

Questo vitello stabilisce, a mio modo di vedere, quasi l'anello di congiunzione fra i risultati dati dalla vitella C e quelli della vitella L, sebbene la tecnica preparatoria sia stata diversa per tutti e tre.

***

La preparazione della vitella I con tubercolosi aviaria (18 mgr.) ha dato risultati che si discostano dai precedenti. Ho dovuto sacrificare l'animale dopo soli 4 mesi e mezzo dall'innesto di tubercolosi bovina nelle vene. Non si trovò traccia di tubercolosi nè antica nè recente in nessun viscere e il numeroso lotto di cavie innestate con frammenti di tutti gli organi restò incolume da tubercolosi e solo alcune morirono di marasma (milza, fegato).

Un confronto di questo risultato, meglio che con le vitelle B e C che vissero per molti mesi dopo la inoculazione di tubercolosi bovina, va fatto con le vitelle L ed N che furono uccise breve tempo dopo il trattamento con bacilli della tubercolosi perlacea. La L sebbene avesse ricevuto solo 12 mgr. di massa bacillare sottocute presentò an-

cora dopo 3 mesi e mezzo bacilli nella milza, nel midollo osseo e nelle ghiandole linfatiche, capaci di produrre la tubercolosi nelle cavie. Il vitello N che ne aveva ricevuti 25 mgr. era già tubercoloso 6 mesi dopo l'innesto. Con la stessa dose di 25 mgr. la vitella I invece mostrò che aveva già dopo 4 mesi e mezzo distrutti tutti i bacilli bovini.

Poteva dunque credersi questa volta conseguita la vaccinazione. La diversità di comportamento verso la tubercolosi aviaria, presentata da questa vitella in confronto con la vitella H del Maffucci, io credo che sia dipesa esclusivamente dalle quantità diverse di bacilli iniettati e forse dalla brevità del tempo, rispetto alla dose avuta, in cui fu mantenuto in vita quell'animale.

***

In riguardo alle prove fatte con la vitella G trattata prima con tubercolosi bovina naturalmente attenuata, poi con tubercolosi bovina virulenta sotto la cute, eccone i risultati. L'animale si conservava in ottima salute, ma era residuata nel punto del primo innesto una larga infiltrazione del tessuto che dapprima pastosa diveniva sempre più dura riducendosi con estrema lentezza: ad 8 mesi di distanza dal secondo innesto, mentre era stata negativa alla tubercolina umana iniettata nelle vene, aveva dato reazione di 1.3 grado alla tubercolina bovina e più tardi le reazioni s'erano seguìte con risultati incostanti e saltuari. Dopo 16 mesi l'autopsia dimostrò nei polmoni un processo cicatriziale di data antica che interessava anche la pleura per una discreta estensione: non esistevano però noduli tubercolari recenti nè focolai caseosi; anche il primitivo punto d'innesto ancora tumefatto e le ghiandole linfatiche più vicine erano in gran parte costituiti di tessuto sclerotico cicatriziale con qualche tubercolo allo stato fibroso e senza bacilli come dimostrò anche l'innesto alle cavie. In una glandola sola della località stessa, e più grossa delle altre, si trovò una piccola raccolta caseosa non più grossa di un cece, nella quale i bacilli in gran parte erano allo stato granulare, ma capaci di produrre ancora la tubercolosi nelle cavie, sebbene non si riuscisse a coltivarli.

Per quanto esaminato con ogni diligenza il corpo dell'animale, era questo il solo focolaio virulento che ancora persistesse. Dobbiamo credere che esso col tempo sarebbe scomparso con gli altri o avrebbe forse ancora costituito una continua minaccia per l'animale? Non possiamo difatti negare che con la tecnica usata residuano spesse volte, e l'ha notato anche Schlegel, focolai caseosi nascosti, capaci in un tempo ulteriore di espandersi nell'intero organismo. Ad ogni modo

anche su questa vitella la vaccinazione parrebbe riuscita in buona parte, giacchè prendendo a confronto la vitella D che aveva avuto presso a poco la stessa dose di tubercolosi bovina sottocute, dopo 10 mesi soltanto l'abbiamo veduta con tubercolosi di tutti gli organi.

Il risultato di questo tentativo bisogna confessare si fondava su un fatto un po' empirico e dirò accidentale, dal momento che non prevedevamo, nè abbiamo potuto calcolare il grado di attenuazione cui era giunto il materiale d'innesto servito la prima volta. Non è improbabile, ed altre esperienze potrebbero in seguito dimostrarlo, che i bacilli della tubercolosi bovina attenuati, meglio che quelli della tubercolosi umana virulenta, siano capaci di determinare una vaccinazione dei bovini verso la tubercolosi perlacea: ed io non sarei alieno ad ammetterlo (1).

Per il momento, anche rilevando il fatto che i bacilli della tubercolosi aviaria in un caso e quelli della tubercolosi bovina attenuata in un altro, hanno conferito ai vitelli una resistenza assai più pronunziata di quanto non abbian fatto i bacilli della tubercolosi umana, io non entro in apprezzamenti, credendo a tale scopo troppo ristretto il mio materiale sperimentale. E qui non per un aprioristico scetticismo nel principio o nel metodo, ma proprio per la scarsezza dei risultati certamente positivi, di fronte a quelli più numerosi negativi ed incerti, che devon sempre mettere in guardia da apprezzamenti affrettati e da facili entusiasmi, io mi domando se ci troviamo qui di fronte a vere procurate vaccinazioni o non piuttosto ai risultati che eventualmente possono offrire animali naturalmente poco suscettibili. E ciò con tanta più ragione in quanto che è noto che la disposizione dei bovini ad assumere la tubercolosi perlacea è assai varia; osservazioni ed esperienze fatte su larga scala dimostrano infatti che questa disposizione varia non soltanto da razza a razza, ma da individui ad individui d'una medesima razza, così che mentre alcuni ne sarebbero vittime con grande facilità, altri vi resisterebbero naturalmente ed energicamente (Schlegel, Hutyra, Kitasato, ecc.).

Un fatto però di cui bisogna tener conto badando ai risultati di queste due ultime vitelle, è che la preparazione fu ottenuta con materiale diverso per qualità e per quantità dalle altre, nelle quali la tubercolosi umana virulenta ad alte dosi, come fu usata dal Maffucci, pur sopportata dagli animali e pur rendendoli più resistenti, non si è mostrata adatta a conferire una vera vaccinazione. Resta però sempre

---

(1) Eber ha ottenuto un'immunità dei bovini servendosi nel trattamento preparatorio di bacilli tubercolari d'origine diversa e fra questi anche di bacilli bovini attenuati con l'azione del tricloruro di jodio.

poco chiaro perchè non ostante la piccolezza delle dosi e l'attenuazione artificiale del materiale d'innesto, la vaccinazione non sia riuscita nella vitella N.

*
* *

Un argomento interessante era senza dubbio stabilire se la tubercolosi umana, che rappresenta certamente pei bovini un virus attenuato, quando venga passata attraverso i bovini acquisti una virulenza maggiore pei bovini stessi ed assuma i caratteri biologici e culturali della tubercolosi bovina.

Trovandomi ad avere innestato le vitelle con tubercolosi umana molto virulenta, ero in migliori condizioni di rispondere al quesito che non quei sperimentatori che avendo iniettato bacilli della tubercolosi umana naturalmente o artificialmente attenuati, ne videro, dopo il passaggio attraverso i vitelli, più spiccata la virulenza per questi ultimi. Concludere da quest'ultimo fatto che la tubercolosi umana passata attraverso i bovini si trasformi prendendo i caratteri della tubercolosi bovina, non ritengo che sia, solo per ciò, giustificato: una tubercolosi attenuata si esalta nella sua virulenza attraverso gli animali allo stesso modo di ogni altro virus che abbia subìto una qualunque attenuazione, senza perdere dei suoi caratteri biologici.

Una mia vitella (M) che fino al momento dell'esperimento era restata nella stalla solo per controllo dell'accrescimento in peso degli altri animali, e che era affatto sana, io trattai sottocute con 100 mgr. di massa bacillare ricavata da culture di un nodulo caseoso sottocutaneo della vitella F, residuato ad un primo innesto endovenoso di tubercolosi umana e restato all'intorno della vena per 8 mesi nella vitella: le culture adoperate avevano subìto solo 7 passaggi su siero di sangue solidificato. Il comportamento della vitella non differì in nulla da quello delle altre trattate con bacilli della tubercolosi dell'uomo sottocute (febbre dopo alcuni giorni, ingorgo locale tendente al riassorbimento, dimagramento e più tardi scomparsa della febbre, aumento di peso, ecc.) e vinse completamente l'infezione: anzi dopo solo 3 mesi era già negativa alla tubercolina bovina, mentre la vitella L dopo 4 aveva reagito positivamente. Ripetei nelle vene l'iniezione dello stesso materiale in dose doppia (200 mgr.) a cui seguì febbre alta (41°) per 24 ore e abbassamento temporaneo del peso; lo stesso quadro clinico cioè presentato dalle vitelle iniettate con tubercolosi umana nelle vene. Ucciso l'animale dopo 3 mesi dall'ultimo innesto non si trovò traccia di tubercolosi negli organi interni, e le cavie innestate con pezzetti di questi dettero risultato negativo: solo alcune ghiandole linfatiche del

l'inguine (punto del primo innesto) si trovarono trasformate in piccole saccoccie fibrose con sostanza caseosa assai densa e bacilli frammentati e granulosi, che si riuscì tuttavia a coltivare e che dettero tubercolosi nelle cavie.

Questa esperienza non mi pare abbia bisogno di maggiori commenti: passata attraverso i bovini, la tubercolosi umana virulenta dopo 8 mesi di soggiorno in un'altra vitella non modifica i suoi caratteri e resta rispetto ai bovini ancora con le sue qualità di virus attenuato; che anzi se si dovesse stare strettamente al risultato clinico e necroscopico, comparativamente agli altri animali, parrebbe che fosse avvenuta un'attenuazione del virus.

Le culture ricavate dalle ghiandole linfatiche di questa seconda vitella (M) nella quale i bacilli erano restati localizzati 6 mesi e mezzo, io passai ancora attraverso le vene di due pecore nella proporzione di 8 mgr. Una di esse fu uccisa dopo due mesi e mezzo e fu trovata con lieve tubercolosi al polmone apparentemente in via di guarigione; l'altra dopo sei mesi dall'innesto era tuttora vivente e negativa alla tubercolina, mentre due controlli che erano stati in precedenti esperienze (1) trattati con la stessa quantità di bacilli di provenienza bovina erano morti tubercolosi 15 giorni dopo l'iniezione (2).

Questa diversità ben spiccata di virulenza fra i bacilli della tubercolosi umana e quelli della tubercolosi bovina, che già di per sè tende, secondo Koch (3), a farle considerare come due specie distinte già nettamente differenziate, per quanto provenienti forse da uno stipite unico, si fa anche risentire in animali eminentemente sensibili alla tubercolosi in genere, come la cavia. Ho provato in numerose esperienze che emulsioni tenuissime che avevano in sospensione un numero assai

---

(1) A questo proposito dirò incidentalmente che le prove di vaccinazione nelle pecore, cominciate dal Maffucci e da me proseguite, non hanno dato risultati ben definiti in un senso o nell'altro, essendoci disgraziatamente imbattuti in un lotto di animali affetti da distoma epatico, il che ha turbato il buon andamento delle esperienze. E' perciò che di queste io non ho fatto cenno.

(2) Questa pecora servì posteriormente per esperienze di altra indole: uccisa dopo 11 mesi in seguito ad un salasso troppo copioso, non si trovò nessun focolaio di tubercolosi e le cavie innestate con pezzetti dei suoi organi restarono negative.

(3) Jatta e Gosio riferiscono che secondo le loro ricerche il materiale di origine bovina produsse sempre nei bovini alterazioni gravi e diffuse a tutti gli organi, mentre il materiale umano, ricavato dall'espettorato o non attecchì o produsse solo alterazioni limitate al luogo dell'inoculazione: concludono che l'infezione naturale nei bovini avviene di regola da animale ad animale, senza alcuna partecipazione dell'uomo tubercolotico, e che è molto giustificata l'ipotesi che anche nell'uomo l'infezione naturale si compia di regola da uomo ad uomo senza intervento dei bovini affetti da tisi perlacea.

piccolo di bacilli, ottenuto con progressive diluizioni, di vari tipi di tubercolosi umana di provenienza diversa, di quella ricavata dalle ghiandole linfatiche caseose della vitella M che aveva subìto due soste prolungate (8 mesi - 6 mesi e ½) nei bovini e di 4 tipi diversi di tubercolosi bovina si comportavano diversamente. Le cavie innestate con emulsioni di queste ultime a parità di condizioni morirono sempre e senza eccezione assai prima di quelle innestate indifferentemente con emulsioni di tubercolosi umana o di tubercolosi umana dirò due volte bovinizzata. Anzi quelle stesse quantità di emulsione che per la loro estrema diluizione restavano, se preparate con bacilli di queste ultime qualità, inattive nelle cavie, si conservavano invece ancora capaci di produrre una tubercolosi delle ghiandole linfatiche, e magari miliare, se contenevano bacilli bovini. Gli stessi risultati ho ottenuto in prove fatte sui conigli e sui cani (in questi ultimi per la via venosa).

Di più i prodotti tossici di queste diverse qualità di bacilli, che io ottenevo con prolungate macerazioni a 48° e 50° e successiva filtrazione con Kitasato, si dimostrarono ancora maggiormente attivi per la tubercolosi bovina che per le altre.

Aggiungerò infine che anche i caratteri delle culture ricavate dal polmone della vitella F e poi dalle ghiandole della vitella M erano del tutto simili a quelli della tubercolosi umana. Ed è questo un criterio che ha anche il suo valore, giacchè i caratteri culturali differenziali, per i molteplici tipi che ho avuto in pratica, sono sempre assai distinti e costanti. Senza entrare in dettagli dirò solo che su siero di sangue glicerinato mentre i bacilli della tubercolosi umana hanno sviluppo rapido con patina spessa, soffice, leggermente umida e pastosa e danno luogo prima a caratteristiche nervature e più tardi a rilievi cordonali, somiglianti a circonvoluzioni cerebrali, quelli della tubercolosi bovina invece presentano un accrescimento più tardivo e stentato e formano una patina secca, arida, con squame crostacee o isolotti confluenti dello stesso aspetto. E' solo nelle culture che hanno subito assai numerosi passaggi che questi caratteri si modificano alquanto, quasi andassero adattandosi al diverso stato di vita saprofitica, senza però mai scomparire; così che ad un occhio esercitato non possono sfuggire le diversità ancora persistenti e forse continue.

Del resto anche Arpad, e più tardi Preiss l'ha anche confermato, trova che i bacilli umani su patate glicerinate danno senza eccezione culture giallo-rosso-ranciate, il che non avviene pei bacilli bovini: e le esperienze di Kossel e Beck hanno dimostrato ancora un più rapido accrescimento dei bacilli della tubercolosi umana rispetto a quelli della

tubercolosi bovina sui più vari sustrati. Allo stesso modo, Smith che è stato uno dei primi a distinguere la specie bacillare bovina da quella umana, non solo nota il diverso comportamento dei bacilli umani e bovini coltivati su siero di sangue coagulato, aggiungendo che ad esso pare che corrispondano anche alcune modificazioni nella morfologia dei bacilli, ma in studii ulteriori ne ha meglio ancora stabilito i caratteri differenziali: questi resterebbero specialmente nella diversa stabilità della virulenza provata in vari modi e nel diverso potere di ridurre affatto l'acidità di speciali mezzi nutrizi, facoltà di cui i bacilli umani non disporrebbero mai. E infine il Ravenel stesso, sostenitore dell'unicità di razza, conviene anche lui sulle spiccate differenze colturali dei due bacilli.

Con ciò io non voglio entrare nel molto dibattuto argomento dei rapporti originari fra tubercolosi umana e tubercolosi bovina, argomento risoluto dai singoli osservatori alla stregua dei risultati delle proprie esperienze. Certo la evidente e notoria virulenza maggiore dei bacilli della tubercolosi bovina, già sufficiente per molti (vedi Spengler), non è in verità carattere bastevole, da solo, a dichiararla una specie diversa da quelli della tubercolosi umana (Pfeiffer), giacchè potranno ben esistere in natura famiglie di bacilli tubercolari bovini la cui virulenza sia così bassa da confinare direttamente con quella dei bacilli della tubercolosi umana, come, d'altra parte, potranno forse anche ritrovarsi razze di bacilli tubercolari dell'uomo che assurgano ad una virulenza sensibile anche pei bovini. E le osservazioni di Fibiger e Jensen e quelle di Eber parrebbero dimostrarlo. Ma Eber dopo che, in una prima serie di esperienze, avrebbe determinato nei vitelli, con l'inoculazione di prodotti tubercolari umani, una tubercolosi rapida e generalizzata, e dopo aver riprodotto nei vitelli una tubercolosi più virulenta con materiale prelevato da una tubercolosi primitiva intestinale, conclude che i resultati generali non sono in favore delle idee di Koch: essi stabiliscono che la tubercolosi umana può ammazzare il vitello, che la tubercolosi bovina può infettare l'uomo, ma non conferma l'ipotesi delle due specie distinte di bacilli tubercolari. Però anche recentemente Baumgarten ed Hegler tenderebbero ad ammettere una diversità fra bacilli umani e bacilli bovini; e rilevando il fatto che i bacilli tubercolari virulenti dell'uomo possono servire da vaccino contro la tubercolosi bovina, come anche a loro stessi è riuscito, trovano che ciò è in accordo e non in contradizione, come credono altri, con la dottrina di Koch sulla dualità bacillare. E infine Lignières va anche più oltre, assegnando alle due varietà di bacilli caratteri patogeni speciali e costanti.

Le ricerche di Ravenel dimostrerebbero che una cultura di tubercolosi umana aumenta la sua virulenza mediante successivi passaggi nei vitelli e ciò sarebbe in perfetto contrasto con quanto io ho ottenuto. Ma io mi domando con quale razza di bacilli umani sperimentava il Ravenel, dal momento che già il primo vitello infettato direttamente con cultura ottenuta dagli organi tubercolosi dell'uomo moriva in tre mesi e mezzo.

E' certo però che le mie esperienze dimostrano come non sia facile modificare i caratteri della tubercolosi umana col passarla attraverso i bovini. Potrà forse sembrare insufficiente il numero di passaggi nelle mie vitelle ad ottenere cangiamenti essenziali dell'un tipo nell'altro; ma si consideri che io partivo da una tubercolosi umana già molto virulenta, che non aveva bisogno di più passaggi per rinvigorirsi fino ad ottenere eventualmente virulenze equivalenti a quella della tubercolosi bovina: di più un numero assai limitato di passaggi, ed anche uno solo prolungato, pareva, in esperimenti collaterali di altri osservatori, che fosse stato sufficiente a modificare i caratteri di una specie nell'altra (così Nocard con la tubercolosi umana passata attraverso il peritoneo del pollo (1), così Seriopulo con la tubercolosi di pollo passata pei bovini, così Behring con la tubercolosi umana passata attraverso la capra).

Anche Kossel, Weber e Heuss nel loro recentissimo e interessante studio comparativo sui diversi tipi di bacilli tubercolari, escludono ogni possibile trasformazione dei bacilli umani in bacilli bovini passati attraverso la capra e i vitelli, come sostengono che anche dopo lunghi soggiorni nell'uomo (tubercolosi intestinale primitiva) i bacilli bovini non si modificano, non si trasformano in bacilli umani.

Ma io dò un maggior rilievo ai risultati forniti dalle pecore, che sensibilissime alle piccole dosi di tubercolosi bovina (2 mgr. uccidono l'animale in 30-50 giorni), non mostrarono verso la tubercolosi umana due volte bovinizzata un maggior risentimento che verso la tubercolosi umana. Credo piuttosto che ad ottenere dati più sicuri e convin-

(1) Le recenti ricerche di Weber e Bofinger dimostrano al contrario che i bacilli della tubercolosi aviaria e quelli della tubercolosi dei mammiferi sono specie diverse e se alcuni tipi di quelli assomigliano a questi o viceversa, non esistono mai caratteri di passaggio degli uni negli altri: due anni di soggiorno della tubercolosi aviaria nei mammiferi non ne modificano la virulenza nè i caratteri. Pare inoltre che anche in condizioni normali si possa avere negli uccelli un'apparente modificazione del bacillo aviario, così da assomigliare a quello dei mammiferi e viceversa. Anche più recentemente Kossel, Weber e Heuss han dimostrato che la trasformazione del bacillo della tubercolosi aviaria in bacillo dei mammiferi non può realizzarsi neppure dopo una lunga serie di passaggi negli animali adatti.

centi bisognerà forse cambiare o modificare il dispositivo sperimentale, come sarebbe stata mia intenzione se ne avessi avuto la possibilità, permettendo ai bacilli dell'uomo di conservare anche nel bovino intatta la loro virulenza: perchè data la refrattarietà più o meno accentuata dei vitelli alla tubercolosi umana, è giusto pensare che il materiale prelevato da essi avrà più volentieri subìta un'attenuazione che non un esaltamento pei poteri di reazione degli animali stessi.

Da tutto ciò io credo che *allo stato odierno delle cose, e tenendo conto di tanti risultati sperimentali, non tutti concordi fra loro, se non possiamo ritenere che tubercolosi umana e tubercolosi bovina rappresentino entità bacillari diverse nella loro origine, potremo ben pensare che per l'adattamento in un diverso terreno nel quale successivamente e progressivamente si sono venute modificando e specializzando le qualità biologiche di una stessa specie bacillare, si siano a mano a mano distinti per ciascuna dei caratteri proprii, forse poco e non facilmente suscettibili di ulteriori modificazioni.*

***

L'ultima parte di queste ricerche riguarda la refrattarietà verso la tubercolosi acquisita dai figli di genitori vaccinati. Ed è forse questo, quando dai tentativi di oggi sorgerà la vera via che porta alla vaccinazione, uno dei problemi più interessanti intorno a cui si rannoderanno oltre ad un gran numero di questioni della più alta portata scientifica ancora questioni d'indole economica di grande interesse pratico, quali ad esempio la qualità di razza dei discendenti di genitori vaccinati; le proprietà generatrici, lattifere, ecc., di queste razze immuni.

Veramente io non mi trovavo ad avere un vitello, figlio di madre vaccinata, giacchè, come ho detto, la madre del vitello nato, che fu creduta vaccinata per un lungo periodo di tempo, morì più tardi di tubercolosi. Però è certo che questo vitellino fu concepito in quella epoca in cui i dati clinici e quelli comparativi con gli altri animali, dovevano far ritenere che la madre fosse, almeno temporaneamente, vaccinata. Il vitellino fu tenuto per un certo tempo in osservazione; era in ottima salute e cresceva in proporzioni ordinarie, nonostante la scarsa alimentazione materna a cui si cercava sopperire con somministrazione di altro latte: fu negativo per due volte alla tubercolina. A due mesi pesava kg. 125: gli furono iniettati sotto la cute 10 mgr. di massa bacillare di tubercolosi bovina, e ne seguì una reazione febbrile assai alta ed un forte abbassamento della nutrizione e del peso. La febbre fu quasi continua con brevi remittenze e l'animale morì dopo 65 giorni con tubercolosi progressiva miliare generalizzata.

Tenendo conto che questo vitello ha avuto una dose di bacilli assai minore in proporzione di quella avuta dal vitel'o O (che può servire qui come di controllo) e che per di più non l'ha ricevuta per le vene come quest' ultimo, ma sotto la cute, e che come animale di età più giovane avrebbe dovuto disporre naturalmente di maggiori resistenze alla tubercolosi (Behring), bisogna concluderne che la recettività dell'animale verso la tubercolosi bovina era aumentata (1). E dato il carattere e le modalità con le quali s'è svolto l'esperimento non mi pare opportuno aggiungere altre osservazioni in proposito.

***

Questi i fatti: e riassumendoli io non so se dobbiamo sentirci molto confortati dai risultati. Certamente sull'efficacia del processo di Behring per l'immunizzazione dei bovini non è ancora possibile dare un giudizio definitivo, giacchè prima dovrà raccogliersi una quantità sufficiente di prove ottenute con la tubercolina e, meglio ancora, di reperti necroscopici. Secondo le esperienze di Roemer, Thomassen, Neufeld, Schlegel, Lorenz, Klimmer, Hutyra, Maffucci, Baumgarten ed Hegler, e le mie, il principio di Behring darebbe un certo affidamento: cioè che le culture di bacilli della tubercolosi umana [o della scimmia (Hutyra) o degli uccelli (Pepere) o anche dei bovini stessi ma attenuata (Pepere), che rappresentano tutte insieme virus attenuati pei bovini] producono nei vitelli giovani una maggior resistenza alla tubercolosi bovina. Però anche considerando come stabilito questo principio generale confermato da varie parti, se diamo uno sguardo a quanto riportano i diversi osservatori appare manifesto che non mancano risultati in parte sfavorevoli; e giudicando anche aprioristicamente non possiamo escludere che anche di fronte alla maggiore o minore suscettibilità di una immunizzazione stanno le qualità di razza e quelle individuali. Le pazienti ed utili ricerche di Brancoli-Busdraghi, che disgraziatamente non hanno trovato tutto l'appoggio morale e la considerazione che esse meritavano, lo dimostrano con molta evidenza: per ciò che riguarda più direttamente noi, le razze importate del Friuli, della Carnia, della Slavonia, delle regioni danubiane sono affette in forte proporzione dalla tubercolosi, mentre quelle di Belluno, della Calabria, della Sardegna, sembra che godano di un alto grado di immunità verso

(1) Allo stesso risultato pare sia giunto Eber: i vitelli nati da due vacche vaccinate con bacilli tubercolari d'origine diversa (bacilli bovini attenuati con tricloruro di iodio e b. umani per la prima — b. umani, b. bovini e b. aviarii per la seconda) non hanno presentato una resistenza maggiore dei controlli morti con tubercolosi generalizzata dopo 33, 66 e 69 giorni dall'inoculazione.

la malattia. E così nel corso delle esperienze di Schlegel e di Hutyra, come ho già accennato, risultò che i vitelli non vaccinati posseggono un potere di resistenza assai variabile e che possono essere quasi altrettanto resistenti che quelli vaccinati. A questo proposito anzi, in riguardo alla varia suscettibilità a seconda delle razze, sono interessanti le recenti osservazioni di Kitasato, dalle quali risulta che i bovini indigeni giapponesi in condizioni naturali non sono quasi affatto suscettibili alla tubercolosi bovina, e che anche sperimentalmente e con alte dosi non contraggono sempre l' infezione (6 su 15), così tentando la via peritoneale che quella venosa, mentre restano sempre refrattari per quella sottocutanea: e ciò in confronto di 5 animali di razza mista, refrattari come i primi alla tubercolosi umana, di cui 4 divennero tubercolosi. Allo stesso modo Preisz non ha potuto sempre riprodurre in tutti i suoi vitelli infettati una vera tubercolosi, anche servendosi di 12 specie diverse di culture di bacilli bovini e tentando fra le altre anche la via digerente: e ne deduce che la presenza del bacillo spesso non basta da sola a produrre la tubercolosi, ma che il suo attecchimento dev'essere favorito da certi fattori, quali l' età, lo stato di salute e di nutrizione, e da certe particolarità individuali che sfuggono ad una giusta nostra valutazione: « lo stesso, egli aggiunge, deve accadere per la tubercolosi umana, poichè solo così si spiega come ad onta delle occasioni di contagio ovunque presenti, non vi siano ancora molti più uomini tubercolosi ».

Di più, in molti casi, le reazioni manifestatesi in seguito alle inoculazioni sono state assai intense (Klimmer, Maffucci), mentre Behring e Roemer le credono possibili solo quando gli animali sono già tubercolosi prima dell' iniezione. Strelinger fra 67 bovini vaccinati, ebbe in 19 (28 %) reazione positiva alla tubercolina dopo 6 a 16 mesi: bisognava pensare che questi animali erano divenuti tubercolosi, o posteriormente per coabitazione o in seguito all' inoculazione stessa, perchè una tubercolosi congenita o preesistente si sarebbe già rivelata all'atto dell' inoculazione, che provoca reazioni al pari della prova alla tubercolina (Kitt). Altri animali non avrebbero raggiunto una sufficiente resistenza neppure con dosi più forti della doppia vaccinazione di Behring, ciò che sembra sia accaduto anche nel mio vitello N, forse non sufficientemente vaccinato, nonostante che le dosi preparatorie fossero un po' più alte di quelle stabilite da Behring; mentre da prove di Schlegel, di Hutyra e di Maffucci ancora parrebbe, come ho già fatto rilevare, che la ripetuta applicazione di virus tubercolare può produrre una certa ipersuscettibilità verso un' infezione posteriore.

D'altra parte è anche notevole il fatto riportato da Schlegel che

in due suoi vitelli preventivamente vaccinati a Marburgo dallo stesso Behring, e che avevano acquistato una reale resistenza, la cura vaccinante aveva residuato dei focolai tubercolari e per di più alla macellazione in uno di essi fu trovata una tubercolosi generalizzata benchè di tenue grado. Ed ho anch'io già precedentemente rilevato come uno degli inconvenienti del metodo di vaccinazione, resti proprio nella persistenza di focolai tubercolari, con bacilli vivi e virulenti, per un lungo periodo di tempo negli organi degli animali e più specialmente nelle vicinanze dei punti d'innesto. Così ancora mentre Hutyra in una prima serie di esperienze in animali vaccinati trovò sviluppo di processi tubercolari assai lievi e limitati ai soli polmoni, laddove i controlli non vaccinati erano morti in breve tempo, in una seconda serie due vitelli vaccinati ammalarono di tubercolosi alimentare e un altro di grave tubercolosi tonsillare e delle ghiandole linfatiche retrofaringee.

Baumgarten ed Hegler in animali resi immuni da 2 anni e mezzo avrebbero ottenuto l' immunità già con una sola iniezione di bacilli umani per la via sottocutanea che credono più adatta, certo più pratica, e che forse, aggiungono, potrà un giorno eventualmente estendersi alla lotta contro la tubercolosi umana. La efficacia di un unico intervento preparatorio sottocutaneo, riconosciuta anche da Klemperer, risulta evidente ancora dalla mia vitella G, trattata in primo tempo con tubercolosi bovina attenuata: però in vista di altri risultati precedentemente esposti (di Strelinger, miei, ecc), è a domandarsi se una tale pratica potrà ogni volta riuscire efficace, disponendo, come ora, di un materiale di preparazione la cui virulenza cambia da caso a caso.

Quello su cui non convengo con Baumgarten ed Hegler, è che l'affezione locale che compare nei vitelli in seguito all'iniezione sottocute di bacilli umani virulenti, non abbia i caratteri anatomici di un processo tubercolare, perchè i bacilli non vi proliferano, ma periscono; e che si tratterebbe invece di semplici alterazioni infiammatorie, come seguono all'introduzione di corpi estranei non specifici o di bacilli tubercolari morti. Dai miei esperimenti e dalle mie osservazioni istologiche risulta invece, che oltre che i bacilli possono restar vivi e virulenti per lungo tempo (fino 16 e 18 mesi) nel tessuto sottocutaneo dei vitelli (F, L, G, M), vi determinano alterazioni, bensì circoscritte e incapsulate, ma con veri caratteri anatomici tubercolari (tubercoli in varie fasi con bacilli, cellule giganti, ecc.). Che anzi, questo fatto dà pieno valore alla dottrina del Maffucci, a cui ho già in precedenza accennato, sul processo anatomico tubercolare che si svolge negli animali refrattarî e che tende a guarigione, giacchè il tubercolo rappre-

senta proprio il meccanismo col quale l'animale si sbarazza del bacillo vincendo l'infezione.

In una nuova e recentissima pubblicazione lo stesso Baumgarten con Hegler annunziano i buoni risultati di un siero antitubercolare ottenuto da un vitello vaccinato. Quello stesso siero che in precedenti esperienze s'era mostrato ad essi, a Rappin e Blaizot, allo stesso modo che a me, insufficiente a guarire e a prevenire la tubercolosi nelle cavie e nei conigli, si sarebbe mostrato invece di sicura efficacia preventiva in un vitello, non curativa però in un altro.

Risultati affatto positivi assicura d'aver ottenuto Friedmann; egli partendo dagli studi di Moeller sui bacilli acido-resistenti dell'anfesibena, avrebbe trovato che una sola ed unica iniezione di bacilli tubercolari della tartaruga (che rappresenterebbe a quanto pare l'ideale di un vaccino, dando produzione scarsa di tubercoli nelle cavie, localizzati e passanti a guarigione ed essendo assolutamente innocua ancora per la maggior parte degli animali), come già aveva trovato che salvava la cavia dalla tubercolosi umana, salverebbe anche i bovini dalla tubercolosi loro propria. Mediante la stessa qualità di bacilli, egli avrebbe ottenuto anche sieri capaci di proteggere le cavie dall'infezione tubercolare virulenta, ciò che in verità finora non sarebbe riuscito a molti.

Ma così belle speranze, per quanto il Friedmann c'insista ancora, sembrano poco fondate, giacchè Libbertz e Ruppel vengono a smontarle una ad una: la tubercolosi della tartaruga determinerebbe, all'opposto, negli animali a sangue caldo delle intossicazioni assai gravi da comprometterne la vita, e l'immunità per mezzo di questo virus non si produrrebbe affatto nè nelle cavie, nè nei bovini; infine il siero antitubercolare ottenuto col processo di Friedmann, sarebbe impotente ad influenzare in un qualunque modo il decorso della malattia nelle cavie. Infine gli autori giungono a provare che i due vitelli di Friedmann, come risulta dalle reazioni alla tubercolina e dalla necroscopia, non erano neppure vaccinati contro la tubercolosi. Anche più recentemente Weber e Taute, a proposito della creduta trasformazione dei bacilli tubercolari nell'organismo degli animali a sangue freddo (bacilli acido-resistenti, saprofiti, ordinariamente inoffensivi pei loro ospiti salvo condizioni speciali, dei quali il tipo resterebbe nel bacillo di Bataillon, Dubard e Terre, a cui si può anche aggiungere quello di Moeller), rilevano che il bacillo della tartaruga di Friedmann non ha proprio nulla di speciale, le sue qualità avendole essi vedute spesso ripetersi fra i 36 tipi studiati.

E sempre a proposito di vaccinazioni Levy, di Strasburgo, crede d'esser giunto allo stesso risultato di vaccinare le cavie mediante ripe-

tute iniezioni di bacilli tubercolari umani che avevano perduto ogni virulenza dopo un trattamento prolungato in una soluzione di glicerina all'80 %. Ed Heymans con esperienze che egli stesso trova ancora insufficienti, e fondate sul principio dell'assorbimento dei prodotti solubili secreti dai bacilli dell'uomo o dei bovini, quando vengano coltivati *in vivo* secondo il metodo di Metchnikoff, intravede la possibilità di ottenere per tale via « la vaccinazione antitubercolare curativa dei bovini tubercolosi ».

Klemperer che ha provato senza successo il potere immunizzante dei bacilli della tubercolosi umana in bovini spontaneamente tubercolosi, avrebbe ottenuto in bovini resi sperimentalmente tubercolosi, una guarigione del processo intervenendo con bacilli umani dopo 10 giorni dal primo innesto, mentre già dopo 18 l'intervento sarebbe restato senza effetto.

Secondo Kitt tali incertezze non menomano ancora il valore del metodo, giacchè la maggior parte delle vaccinazioni protettive e specialmente quella del carbonchio sintomatico, del colera dei polli, della peste dei maiali, passano anch'esse per la stessa serie di tentativi più o meno felici. Ed è proprio per le imperfezioni in cui tuttora trovasi il metodo che vanno ancora scrupolosamente salvaguardate e per nulla trascurate tutte le altre misure profilattiche e difensive (Bang e Osterstag) più adatte pel momento e meglio rispondenti allo scopo di proteggere il bestiame dalla tubercolosi.

Così stando le cose, dietro risultati così manifestamente contraddittori e dopo i poco fortunati successi di ogni tentativo sieroterapico, che il recente annunzio di Baumgarten ed Hegler parrebbe voler portare a migliori destini, anche la speranza di applicare all'uomo un metodo preservativo contro la tubercolosi mediante la vaccinazione, appare ancora lontana dal realizzarsi. La ben nota teoria di Behring, che secondo Ravenel sarebbe avvalorata dalle sue esperienze sui cani, sulla origine enterogena della tubercolosi polmonare nell'uomo, per la migrazione del bacillo di Koch attraverso la mucosa del canale intestinale nell'età infantile e sull'importanza quasi esclusiva del latte come mezzo di trasmissione, è stabilita su dati di Heller, che si trovano in contraddizione con quelli di tutti gli altri patologi ed è del tutto arbitraria : e le contestazioni che sorgono passo passo contro tale asserzione (Cornet, Orth, Spengler, e numerosi altri autori) le hanno tolto ogni fondamento: argutamente Tendeloo osserva, che per analogia si potrebbe anche sostenere che il pigmento antracotico del polmone e delle ghiandole peribronchiali giunga qui per le vie linfatiche o sanguigne dall'intestino, dopo essere stato inghiottito con la saliva. Perciò la stessa supposizione di Behring, che somministrando un latte esente da ba-

cilli tubercolari e ricco di sostanze immunizzanti, si possa conferire al tubo digerente un notevole potere di resistenza alla tubercolosi, è basata in parte, così come Behring la sostiene, sopra una serie di ipotesi che celano un equivoco e così poco rispondenti ai dati di fatto che neppure essa ci dà migliore affidamento per l'avvenire. E veramente anche la speranza espressa da Baumgarten ed Hegler, che se non si riuscisse a trovare il siero contro la tubercolosi, si potrebbe conferire all'uomo l'immunità con un procedimento analogo a quello usato per i bovini, adoperando come vaccino, invece dei bacilli umani, quelli bovini, dopo quanto c'informano tanti tentativi sperimentali, è poco rassicurante e la riterremo per lo meno come ancora prematura. Nè l'audace tentativo di Klemperer che a provare l'innocuità dei bacilli bovini per l'uomo, s'inietta sotto la cute dell'avambraccio una tal dose bacillare capace di uccidere le cavie in 4-6 settimane, nè il miglioramento nelle condizioni generali di individui tubercolosi seguito a iniezioni sottocutanee di bacilli della tubercolosi perlacea, ottenuto dallo stesso Klemperer, ci persuade per ora ad adottare questo temerario mezzo terapico.

E' ancora e solo ai benefici criterî dell'igiene pubblica e di quella privata e individuale riserbato il còmpito di limitare l'espansione di così grave ed estesa malattia, che costituisce uno dei danni maggiori dell'umanità moderna dal lato economico, come da quello sociale. E in questo compito perseverante, in cui tutte le forze collettive e individuali dovranno collaborare, sarà necessario allontanare ogni concetto aprioristico o di scuola, avendo presente che se da un lato (anche convenendo che la tubercolosi bovina abbia una parte secondaria nell'incremento della tubercolosi umana) trascurare affatto ogni precauzione igienica e di vigilanza sul bestiame tubercoloso, può riuscire di danno alla salute pubblica, d'altra parte col sostenere in forma assoluta che la lotta contro la tubercolosi umana non potrà riuscire efficace se non si arresti la tubercolosi bovina (Nocard), si devia dalle giuste applicazioni di profilassi, che debbono aver di mira, per quanto è possibile, tutti i pericoli che minacciano l'uomo sano alla mercè di così grandi e numerose cause d'infezione.

CONCLUDENDO:

I bacilli della tubercolosi umana virulenta sono sopportati dai bovini in proporzioni enormi, con disturbi transitori a carico della nutrizione. Dopo un tempo più o meno breve, in ragione delle dosi iniettate, gli animali se ne sbarazzano, dimostrando che per essi la tubercolosi umana rappresenta un virus attenuato.

I bacilli della tubercolosi aviaria, allo stesso modo che quelli della tubercolosi umana, sono facilmente eliminati dai bovini, anche quando vengano iniettati per le vene.

I bacilli della tubercolosi umana, in qualunque modo somministrati ai bovini, conferiscono a questi una indubbia resistenza maggiore alla tubercolosi perlacea (vaccinazione?).

Allo stesso modo, se non forse più energicamente, agiscono quelli della tubercolosi bovina stessa, purchè attenuati, e quelli della tubercolosi dei polli in piccole dosi.

Può un solo intervento preparatorio già conferire ai bovini una spiccata refrattarietà, anche quando esso venga fatto per la via sottocutanea.

Le alte dosi di bacilli della tubercolosi umana, innestate a scopo preparatorio, non producono sempre ipersuscettibilità degli animali verso infezioni posteriori, e questa deve con maggiori probabilità ricercarsi in condizioni speciali dell'individuo.

Frequentemente la cura vaccinante residua negli animali focolai caseosi con bacilli vivi, i quali possono conservarvi intatta, per un tempo assai lungo, la loro virulenza.

I bacilli virulenti della tubercolosi umana in dosi alte, non conferiscono ai bovini una vera vaccinazione verso la tubercolosi perlacea, ma solo una maggior resistenza a carattere transitorio e assai breve, che può essere anche raccorciata da condizioni speciali intercorrenti (gravidanza-parto-allattamento).

Negli animali cosidetti vaccinati i bacilli della tubercolosi bovina vengono in parte distrutti; altri restano annidati per lungo tempo nelle ghiandole linfatiche, nel midollo osseo, nella milza, ecc., e vi conservano la loro virulenza, pronti ad invadere l'organismo al primo segno d'un abbassamento dei poteri fisiologici dell'animale.

I figli concepiti nel periodo d'immunità (relativa) della madre, non riportano alcuna refrattarietà verso la tubercolosi bovina, anzi vi si mostrerebbero anche meno resistenti.

Le qualità del siero di sangue degli animali resi più resistenti alla tubercolosi bovina con trattamento preventivo di bacilli tubercolari umani, bovini (attenuati) e aviarî, si mostrano, nelle cavie e nei conigli, affatto negative, così dal lato immunizzante che da quello curativo.

La tubercolina d'origine dai bacilli bovini si mostra in pratica più adatta che quella preparata con bacilli dell'uomo e del pollo a svelare nei vitelli piccoli focolai latenti di tubercolosi.

I bacilli della tubercolosi umana virulenta passati attraverso i

bovini conservano i propri caratteri biologici e culturali, le due forme bacillari, umana e bovina, rappresentando varietà di una stessa specie con caratteri propri, forse poco e non facilmente suscettibili di ulteriori modificazioni.

A parità di condizioni i bacilli della tubercolosi bovina sono per le cavie, pei conigli, pei cani e per le pecore assai più virulenti dei bacilli della tubercolosi umana.

Le proteine dei bacilli tubercolari dei bovini hanno un esponente tossico assai più alto di quelle dei bacilli dell'uomo e degli uccelli.

Pisa, maggio 1905.

BIBLIOGRAFIA.

BANG. Tuberkulosis, III, 1904.
BAUMGARTEN. Berl. klin. Wochenschr., 1904.
BAUMGARTEN und HEGLER. Berlin. klin. Wochenschr., 1905.
BEHRING. Beiträge z. experim. Therapie, 1902.
BEHRING. München. medic. Wochenschr., 1903.
BRANCOLI-BUSDRAGHI. Il nuovo Ercolani, VIII, 1903.
CORNET. München. medic. Wochenschr., 1904.
EBER. Zeitschrift f. Thiermedicin, IX, 1905.
EBER. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, III, 1905.
FIBIGER und JENSEN. Berl. klin. Wochenschrift, 1902, 1904.
FRIEDMANN. Deutsche mediz. Wochenschr., 1903.
FRIEDMANN. Deutsche mediz. Wochenschr., 1904.
FRIEDMANN. Deutsche mediz. Wochenschr., 1905.
HELLER. München. med. Wochenschr., 1902.
HEYMANS. C. R. de l'Acad. de méd. de Belgique, 1904.
HUTYRA. Beiträge z. experim. Therapie, 1904.
KANDA. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., 1904.
KITASATO. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., 1904.
KITT. Monatshefte f. prakt. Tierheilkunde, 1905.
KLEMPERER. Zeitschr. f. klin. Med., LVI, 1905.
KLIMMER. Berl. thierärztl. Wochenschr., 1904.
KOCH. Congresso inglese contro la tubercolosi, luglio 1901.
KOCH. Deutsche med. Wochenschr., 1902.
KOSSEL, WEBER und HEUSS. Tuberkulose — Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin, 1905.
JATTA e GOSIO. III Congresso ital. di patologia, Roma, 1905.
LEVY. Centralbl. f. Bakteriol. (Orig.), 1903.
LIBBERTZ und RUPPEL. Deutsche med. Wochenschr., 1905.
LIGNIÈRES. Bull. de la Soc. Centr. de méd. vétér., 1904.
MAFFUCCI. La Clinica Moderna, 1903.
MALM und KITT. Jahresbericht d. k. thierärztl. Hochschule. München, 1895-96.

NEUFELD. Deutsche medic. Wochenschr., 1903.
ORTH. Berl. klin. Wochenschr., 1904.
PFEIFFER. Verein f. wissenschaftliche Heilkunde, Königsberg, 1903.
PREISZ. Zeitschr. f. Tuberkulose und Heilstättenwesen, 1904.
RAPPIN et BLAISOT. C. R. de la Soc. de Biologie, 1904.
RAVENEL. The Journ. of med. research., 1904.
RAVENEL. Proceedings of the Path. Soc. of Philadelphia, 1902.
ROEMER. Beiträge z. experim. Therapie, 1903.
SCHLEGEL. Berl. thierärztl. Wochenschr., 1903.
SERIOPULO. Gesellschaft f. Naturkunde, Moskau, 1903.
SMITH. Medical News, LXXX. 1902.
SMITH. Journ. of med. research., XIII, 1905.
SPENGLER. Berl. klin. Wochenschr., 1904.
TENDELOO. Beiträge z. Klin. d. Tuberkulose, Bd. II. 1904.
THOMASSEN. Rec. méd. vét., s. 8, t. X, 1903.
WEBER und BEFINGER. Tuberkulose — Arbeiten, Berlin, 1904.
WEBER und TAUTE. Tuberkulose — Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, Berlin, 1905.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÁ DI ROMA

La malaria in Italia durante il 1904

Ricerche epidemiologiche e profilattiche

Riepilogo di **A. CELLI.**

Le stazioni per lo studio epidemiologico e profilattico della malaria in Italia, durante il 1904, furono più che negli anni antecedenti (1) numerose, in ispecie nel Mezzogiorno e nelle Isole.

In questo volume VI degli Atti della nostra Società sono pubblicate le *relazioni speciali* dei seguenti autori:

Per l'*Italia superiore:* prof. Galli-Valerio (Valtellina e Comasco); dottori Brignone e Alzona (Alessandria); dott. Vaccino N. ed A. (Vercellese); dott. Pezza e Omodei-Zorini (Lomellina); dott. Filippini (Bresciano); dott. Polettini ed altri (Veronese); prof. Bordoni-Uffreduzzi e dott. Bettinetti (Milano); dott. Soliani (Mantovano).

Per l'Italia media: dott. Tusini (Modenese); dott. Mori (Grossetano); dott. Ravicini (Lazio); dott. Boccanera ed altri (Comune di Roma); dottor Campeggiani (Bassa valle del Tevere e dell'Aniene).

Per l'Italia meridionale: prof. Rossi (Bacino del Sele); dott. Labranca e Nicastro (Capitanata); dott. Sergi (Calabria); dott. Martirano e parecchi altri per tutto il Mezzogiorno continentale.

Per la Sicilia: dott. Barbagallo (Catania); dott. Tafuri (Siracusa); dott. Fontana (Ferrovie Sicule); ing. Sbacchi (Ferrovia Sicula occidentale); prof. Manfredi e suoi allievi (Bacino del fiume Torto).

Per la Sardegna: dott. Giunti (Sardara); dott. Lay (Teulada).

---

(1) V. Atti della Soc. per gli studi della Malaria, vol. II-V, 1901-1904.

Da un estremo all'altro d'Italia: ispettore medico Alvaro per l'esercito; dott. Ricchi per le ferrovie adriatiche.

Nello stesso volume VI sono altresì pubblicate le *relazioni su temi generali* come quelle sui culicidi (Galli-Valerio e I. Rochaz-de-Jongh); sulla malaria sperimentale degli uccelli (Casagrandi e Barbagallo): sulla isolisi e autolisi nell'infezione malarica (Casagrandi); sulla recidiva (Carducci); sulla terapia specifica (Gaglio, Modigliani, Martinotti e Castellini).

Per la preziosa collaborazione dei fratelli Sergent (Algeria) e del dott. De Celebrini (Littorale adriatico austriaco), possiamo anche in quest'anno fare utilissimi confronti internazionali.

Rimandando il lettore alle singole monografie (1) degli egregi soci della nostra Società, esporrò secondo il solito qui in breve *quanto per sè e come termine di confronto è più necessario a conoscersi, e di più importante accadde nello scorso anno 1904 intorno alla epidemiologia ed alla profilassi della malaria.*

PARTE I.

Epidemiologia della malaria.

1. — Andamento generale dell'epidemia.

L'annata epidemica del 1904 fu, in generale, assai più grave che la precedente; si deve, anzi, noverare fra le più gravi che si ricordino tanto in Algeria quanto in parecchie regioni d'Italia, come ad esempio lungo il littorale adriatico superiore e medio, nelle Puglie, in Basilicata, nelle Calabrie, in Sardegna. In molti di questi luoghi dopo gli anni 1899-900 non si ricordava un'epidemia simile.

A questa regola generale, della recrudescenza epidemica della malaria nel Mezzogiorno d'Italia, fanno eccezione alcuni luoghi, dove o per una immunità ancora consecutiva a terribili epidemie recentemente sofferte, come a Trinitapoli, ovvero per un benessere economico aumentato, come a Bruzzano Calabro, l'epidemia del 1904 si mantenne relativamente lieve.

Notisi poi che bene spesso nei luoghi di endemia grave, specialmente d'estate e d'autunno, ogni febbre si crede malarica. Soltanto l'esame del sangue può far giustizia di questa esagerazione, come accadde l'anno scorso a Trinitapoli, ove così fu potuto escludere che fossero di stagione molte febbri ch'erano epidemiche in luglio ed agosto.

---

(1) V. Atti della Soc. per gli studi della Malaria, vol. VI, 1905.

La recrudescenza epidemica però non fu avvertita affatto nel Nord d'Europa (anzi in Olanda (1) la malaria, che s'era riaccesa negli ultimi anni, si è rispenta); come non fu avvertita nelle nostre zone anofelico-palustri, senza malaria, di Toscana (2) ad onta delle nuove e ripetute importazioni coi reduci dalle Maremme.

Così pure la recrudescenza non fu notata o si mantenne assai lieve nell'Agro vercellese, mortarese, milanese, mantovano, mentre invece nel territorio di Argenta (Ferrara) e più anche nell'Agro romano e nel Lazio, e in qualche punto del Mezzogiorno (Tuturano, Atella), si deve, come vedremo, in gran parte all'assidua ed energica campagna antimalarica se l'epidemia, ad onta della sua naturale gravezza, fu tuttavia contenuta entro i limiti delle annate più benigne.

Mentre poi i focolai Valtellinesi, che sono in via di estinguersi, diedero vari casi di febbri, invece nel Bresciano, ove pure negli ultimi 30 anni la malaria è venuta man mano attenuandosi, rimase mitissima anche nell'anno scorso. Cosicchè, per fortuna, *le recrudescenze epidemiche più non si avvertono o sono minime dove l'attenuazione epidemica procede da tempo spontaneamente, o dove fu negli ultimi anni provocata dalla assidua nostra azione profilattica.*

***

E' qui importante discutere brevemente qual'è il più perfetto *indice misuratore della intensità epidemica.*

Seguendo il Koch, prima i dottori Christophers e Stevens, poi i fratelli Sergent, hanno scelto come indice epidemico la *percentuale dei bambini infetti.*

Senza dubbio, ovunque la malaria non è molto grave, la percentuale degli infetti è manifestamente più alta nei bambini sotto i 5 anni, decresce alquanto nei ragazzi sotto i 15 anni, decresce di più e arriva al minimo negli adulti.

Valga come esempio che a Vigasio (dott. Polettini) nel 1903, sopra una popolazione totale di 2768 persone, la percentuale di tutti i febbricitanti fu del 29. 42, mentre nei bambini sotto i 5 anni si ebbe il 64.47, nei ragazzi sotto i 15 anni il 32. 18, e negli adulti il 20. 79; e rispettivamente dei soli primitivi nel 1904 la percentuale fu di 6. 24, 13. 97, 5. 80, 4. 81.

Ma *dove la malaria è più grave, tutte le età, e quindi la popolazione intera, ne rimangono infette,* perfino nel rapporto del 70-80-90 e

(1) Comunicazione orale del dott. Schoo.

(2) Comunicazione orale del prof. Gasperini.

più ancora per cento; cosicchè il 20-30 % di popolazione con le febbri è già un segno di annata mite. E l'indice epidemico allora, quando tutta la popolazione ce lo mostra chiaramente, non occorre andare a cercarlo nella sola prima età.

Anche una parte della *popolazione* adulta, per esempio quella *militare*, può darci un prezioso indice misuratore di epidemia.

Così nell'anno precedente, nei vari corpi d'armata si vide dall'Italia superiore in giù crescere in proporzione ascendente il numero dei malarici, e arrivare al massimo nei territori del VII (Foggia), IX (Roma e Sardegna) e XII (Sicilia) corpo d'armata, confermandosi così quanto era già indicato dalla morbosità malarica nella popolazione civile.

E, poi, altri indici epidemici di grande valore, e perciò da non trascurar mai, sono:

1° La *perniciosità*, rispettivamente il numero dei casi di perniciosa, che, variando secondo gli anni, ci indicano con molta esattezza, le variazioni della intensità epidemica;

2° La *recidività*, essendo che le recidive si dimostrano più o meno ostinate secondo i luoghi e gli anni di epidemia;

3° La *proporzione* tra le *febbri gravi*, o estivo-autunnali, e le *febbri miti* come terzana lieve (v. tabella 1).

Fin dal 1901 ho dimostrato, e ho sempre poi confermato che le febbri estivo-autunnali dànno l'impronta loro caratteristica così agli anni, come ai luoghi, di malaria più grave, mentre la terzana lieve dà la sua impronta benigna agli anni e ai luoghi di malaria mite.

Perciò *non uno, ma parecchi sono gli indici epidemici dei quali si deve seguire il movimento, se si vogliono esattamente conoscere le annuali variazioni dell'epidemia di malaria.*

2. — Distribuzione geografica dei parassiti malarici.

Nell'anno passato l'esame del sangue a scopo diagnostico mise in evidenza il seguente e rispettivo numero dei casi di febbre:

TABELLA I.

Località	Estiva autunnale	Terzana lieve	Quartana	Proporzione della terzana grave e lieve
Littorale Adriatico austriaco	31	166	90	1 : 5.35
Provincia di Alessandria	2	158	57	1 : 79.00
Vercellese	9	231	8	1 : 25.66
Lomellina	2	238	1	1 : 119.00
Veronese.	91	194	67	1 : 2.13
Mantova	27	61	14	1 : 2.25
Agro Romano.	46	15	5	1 : 0.32
Foggiano.	278	85	6	1 : 0.30

Sicchè nell'Italia superiore si mantenne sempre alto il predominio della forma terzanaria mite su quella grave; nel Veronese e a Mantova, coll'attenuarsi dell'epidemia, la forma grave ha ceduto il sopravvento alla mite, mentre invece dal Lazio al Mezzogiorno è sempre la forma grave che di molto predomina su quella mite.

La quartana ha conservato la sua già nota distribuzione irregolare.

3. — Recidività delle febbri da malaria.

Sempre allo scopo di conoscere un *mezzo diagnostico della malaria latente*, il Casagrandi ha studiato i processi di isolisi e autolisi nell'infezione malarica degli animali (bovini, uccelli) e dell'uomo.

Si è così confermata la *difficoltà di mettere in evidenza nei sieri dei malarici le proprietà autoliche ed isolitiche;* e ciò forse perchè si produce una scarsa quantità di sensibilizzatrice durante l'infezione malarica, e per quanta se ne produce viene tutta utilizzata *in vivo.*

L'estratto di ghiandole salivari di *culex* e *anopheles* è dotato, non però costantemente, di potere emolitico.

Ricerche eseguite negli animali hanno messo in evidenza nuovi

fatti di autolisi ed isolisi, che forse gioveranno a chiarire gli stessi o analoghi fenomeni anche nell'uomo.

Perciò bisogna battere ancora questa via sperimentale prima che la patologia e la diagnostica dell'infezione malarica ne possano trarre nuove conoscenze e nuovi metodi, utilizzabili nella pratica.

***

Quali sono le forme parasitarie destinate a mantenere le recidive? Quale è il loro ciclo di sviluppo?

E' noto che Grassi suppose e Schaudinn credette aver dimostrato in un caso di terzana lieve la partenogenesi dei gameti (1).

Le ricerche di Carducci non sono però finora riuscite a confermare nel sangue circolante della terzana lieve l'osservazione di Schaudinn, nè a trovare nella terzana grave qualcosa di simile per le semilune (gameti estivautunnali), e nemmeno a trovare negli organi interni (milza, fegato, midollo delle ossa) forme speciali parasitarie che possano credersi quelle che presiedono allo sviluppo delle febbri recidive.

***

A sua volta il dott. Carducci, cercando indagare le *leggi della recidività*, ha potuto stabilire per la febbre estivautunnale che:

La recidiva a breve scadenza succede con massima frequenza al 7° giorno di apiressia completa, in un numero scarso di casi al 6° ed all'8° giorno, in uno scarsissimo al 9° giorno;

Le recidive successive se composte di un solo accesso febbrile succedono nei multipli dei numeri indicanti a giorni il primo periodo di latenza, p. es. $7 \times 2, 7 \times 3$, ecc. Se invece son composte di più accessi succedono sempre dopo un periodo di latenza uguale al primo;

Alcune volte, ma molto raramente, la recidiva salta un periodo;

Quasi tutte le recidive sono precedute da una piccola elevazione febbrile 37°. 2 o 37°. 3, che alcune volte sembra mancare, perchè di breve durata e perciò interposta fra due prese di temperatura;

Le recidive alcune volte sono costituite da febbri molto elevate, altre volte da sole elevazioni di 37°. 8, 38°, però hanno la caratteristica d'anemizzare profondamente il malato, ed in alcuni casi è netta la sproporzione tra il grado di anemia che si svolge sotto i nostri occhi e le lievi ipertermie.

---

(1) Secondo Casagrandi e Barbagallo anche i gameti degli alteridi si moltiplicherebbero per partenogenesi, e per inoculazione sperimentale riprodurrebbero la rispettiva infezione eziandio in altri uccelli, oltre che in quelli dai quali provengono.

Nella quartana e nella terzana primaverile le leggi che governano le recidive sono le medesime che nella estiva, con le seguenti due differenze, e cioè: che la recidiva salta molto spesso un periodo e qualche volta anche due, e che il grado di anemia da essa prodotto è meno grave che nella estiva.

Ora se paragoniamo questi risultati con quelli del Caccini (1), vediamo che in molti punti coincidono, e le piccole differenze sono dovute al fatto che, nei malati del Carducci la temperatura fu presa più spesso, e quindi fu più difficile che sfuggisse qualche recidiva abortiva.

Fu posto anche da vari nostri soci sempre più in evidenza che *la recidività varia secondo l'età degli infetti, secondo la specie dei parassiti malarici e secondo la cura specifica.*

In quanto all' età, ognuno ben conosce con quanta ostinazione le febbri recidivano nei bambini.

Difatti nel Veronese il coefficiente di recidività fu:

negli adulti	4.12 — 15.95 %
nei ragazzi	11.14 — 23 »
nei bambini (sotto 5 anni) . .	47 — 48.18 »

In quanto alla specie parasitaria, la più ostinata a recidivare sembra sia la terzana lieve, cioè quella forma febbrile che essendo la più mite può passare anche inosservata dal medico.

E' questa una ragione della più tenace persistenza della terzana lieve nei luoghi dove la malaria si va spontaneamente attenuando o è già nettamente attenuata come da noi nell' Italia superiore e in parte della media ?

In quanto alla cura specifica fu osservato pure nel Veronese che dal 1903 al 1904, recidivarono ad onta della cura 29 % adulti, 40 % ragazzi, 61 % bambini.

La più alta recidività che si manifesta negli anni più teneri, può aver la sua origine, più che in una maggiore predisposizione organica, nelle difficoltà che incontra il rimedio per quanto specifico, per altrettanto di sapore sgradevole, e quindi assai difficile a somministrare ai bambini.

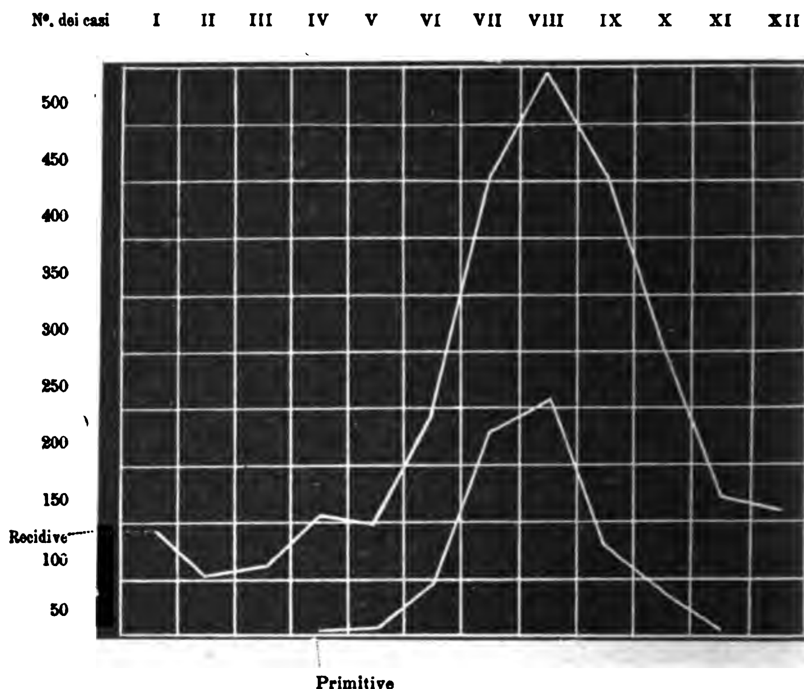
Coi criteri già da me formulati (2) per quanto è possibile differenziando le infezioni nuove da quelle preesistenti, *fu ben assodato che in ogni nuova epidemia si ha delle febbri recidive un notevole predominio sulle primitive*, cioè ogni anno i nuovi colpiti dalle febbri sono in numero sempre minore di quelli che antecedentemente già n'erano infetti.

---

(1) V. Atti della Soc. per gli studi della Malaria, vol. V, 1904.
(2) V. Atti c. s., vol. IV, 1903.

Così la fig. 1 ci mostra il grande predominio delle recidive sulle primitive anche lungo le ferrovie adriatiche meridionali.

Fig. 1. — *Andamento delle febbri recidive e primitive nei vari mesi dell'anno lungo le Ferrovie meridionali nel* 1904.



Similmente in Lomellina le recidive con le primitive furono nel rapporto di 4 : 1 per gli adulti, 2 : 1 pei ragazzi e bambini.

Nel Grossetano (1) furono complessivamente in rapporto di 2.2 : 1, e circa altrettanto nell'Agro Romano.

A questo modo si assicura ad esuberanza il perpetuarsi della epidemia.

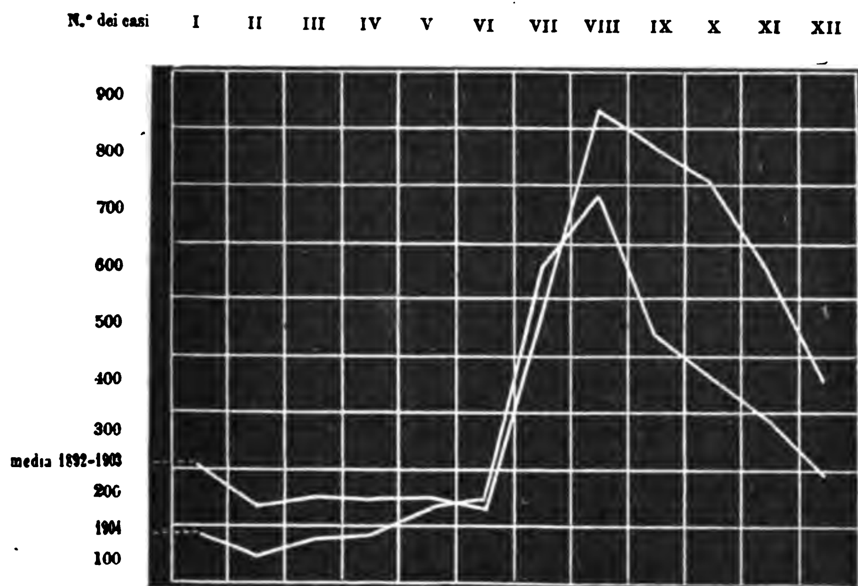
4. — Decorso annuale delle febbri malariche recidive.

La figura antecedente dimostra che le recidive ebbero nel 1904 una recrudescenza preepidemica precoce; l'acme epidemico presto lo raggiunsero in luglio ed agosto, e poi subirono una brusca e rapida diminuzione dal settembre in poi.

(1) M. Luzzatto. Policlinico, Sezione pratica. Anno XII, fasc. 9.

Più che altro, la precoce recrudescenza preepidemica delle recidive così nel Mezzogiorno, come nell'Agro Romano (vedi fig. 2) *fece nel 1904 cambiare il tipo epidemico Sud-Italia*, come si ebbe sempre negli anni 1892-1903 cioè col minimo di tutte le febbri alla fine della primavera (1), *nel tipo Nord-Italia*, col minimo cioè di tutte le febbri nella fine dell'inverno.

FIG. 2. — *Andamento dei casi di malaria negli Ospedali di Roma negli anni* 1892-1903 *e nell'anno* 1904.



5. — Inizio e durata delle febbri malariche primitive.

Le infezioni primitive nel Veronese, con una stagione estiva insolitamente precoce si credeva che anticipassero; invece con un'indagine spassionata il Polettini potè accertare che *non cominciarono prima degli altri anni*, anzi qualche settimana dopo.

Furono difatti infezioni certamente primitive:

---

(1) V. CELLI. *L'epidemiologia della malaria secondo le recenti vedute biologiche*. Atti della Soc. per gli studi della Malaria, vol. II, 1901.

TABELLA II.

	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Terzane lievi	2	13	21	56	30	21	6	2
Id. gravi	..	..	3	15	15	4	..	..
Quartane	..	..	..	2	5	6	5	3

Anche nell' Istria la vera epidemia di malaria con le prime infezioni primitive si manifestò nell'agosto.

L'anno epidemico quindi anticipò specialmente per causa della più precoce recrudescenza delle recidive.

Le infezioni primitive raggiunsero l'acme in luglio-agosto e dalla fine di questo mese alla metà del settembre si abbassarono bruscamente.

Cosicchè la curva epidemica toccò presto il suo apice, e diminuì e si arrestò prima degli anni precedenti (vedi fig. 1 e 2).

6. — Vita delle zanzare in rapporto con l'epidemia di malaria.

Venne sempre più confermato che *col numero delle zanzare anofele non è direttamente in rapporto il numero dei casi di febbre.*

Ad es. nelle risaie del Vercellese con l'estate precoce, lunga e caldidissima, il numero delle anofele fu sterminato, e con tutto ciò l'annata epidemica fu piuttosto mite.

Analogamente nei focolari della Valtellina e del Comasco all'abbondanza oltre ogni dire di anofele corrispose appena una lieve recrudescenza dei casi di malaria.

Ad onta però della precocità del caldo, così nell'Istria e nell'Italia superiore come nella più torrida parte della Sicilia (Piana di Catania), il massimo delle zanzare aeree si ebbe nei mesi di luglio e agosto, e, con le abbondanti e precoci pioggie scemarono presto nei mesi di settembre e ottobre, e cessarono nel novembre; il qual fatto coincide con la più rapida scomparsa dell'epidemia nell'anno scorso.

Fu pure confermato che predominando lo scirocco sono più nojose

e pungenti; il che verrebbe in parte a spiegare l'antica nozione epidemiologica per cui tanto si temeva lo spirare di questo vento nella stagion delle febbri.

7. — Rapporto tra le infezioni degli anofeli e l'epidemia di malaria.

Le osservazioni su questo campo furono assai scarse nel 1904. In piana di Catania le prime zanzare infette si osservarono il 2 giugno.

In Algeria il maggior numero proporzionale di infette si riscontrò come da noi (Martirano, Labranca) in autunno.

Anche dopo le ultime ricerche di Wessel (1) rimane assai problematico se qualche mammifero selvaggio in luoghi inospitali per l'uomo possa albergare emosporidi trasmissibili per qualche insetto succhiatore ovvero se possa l'infezione trasmettersi e mantenersi da zanzara a zanzara, mantenendosi così l'infezione dove manca l'uomo.

Secondo le osservazioni di Jancsò (2) gli emosporidi della terzana lieve e della terzana grave si comporterebbero verso la temperatura ambiente in modo, press'a poco, uguale. Quindi la precocità della prima epidemia nelle regioni più nordiche, nonchè la diversa distribuzione geografica delle due specie parasitarie non dipenderebbero, *sic et simpliciter*, dalla temperatura atmosferica.

8. — Agricoltura e malaria.

Il dottor Polettini nel Veronese ha investigato con grande scrupolosità i *rapporti fra l'epidemia di malaria e i lavori campestri, dalla primavera all'inverno.* Ed ha osservato come per ognuna delle varie operazioni agricole si ha un aumento della recidività, che si ebbe però contemporaneamente anche in tutti gli altri malarici non lavoratori nè addetti a lavori faticosi.

Altrettanto dicasi delle infezioni primitive: cosicchè oltre alle vicende del lavoro agricolo, anche altre cause, specie le climatologiche, regolano l'andamento epidemico della malaria.

I dottori Polettini e Pezza concordano poi nel constatare che la massima morbosità per malaria si ha negli addetti al governo delle stalle e all'aratura dei campi, forse perchè più esposti ai lavori not-

---

(1) Annales de l'Institut Pasteur, 1905.
(2) Centralb. f. Bakt. Vol. XXXVIII (Lavori originali), 1905.

turni, e, durante questi, alle punture delle anofele, essendo notorio che le stalle sono il massimo serbatoio delle zanzare (1).

Venne altresì ristudiata la questione, sempre viva, dei *rapporti fra risaie e malaria.*

Si è constatato che anche nelle provincie di Alessandria e di Brescia un trentennio fa, quando si era per la prima volta introdotta la coltivazione a riso, la malaria fu grave; ma oggi anche nei Comuni tuttora risicoli si manifesta con febbri assai lievi e presto vinte dal chinino.

La permanenza quindi della risaia non ha impedito la fortunata e progressiva attenuazione spontanea dell'epidemia, come è avvenuto nel Vercellese, nella Lomellina, in Toscana.

Con un'inchiesta promossa dall'Ufficio del lavoro (2), per mezzo dei medici condotti, sui reduci dalla monda del riso ai loro paesi salubri, si è rilevato che per 80 Comuni si ebbero soli 574 casi di malaria, e di questi, 161 si svilupparono durante la monda, 413 dopo il ritorno dei mondariso. Si noti poi che il numero dei casi assolutamente nuovi si ridusse a 407, mentre i risaiuoli per soli 52 degli 80 Comuni erano 6142.

Il che viene a confermare che *in moltissime delle nostre risaie la malaria è divenuta mite,* e, in ogni caso, il periodo della monda anche se, come l'anno scorso, fu precocemente calda la primavera, non è ancora il più propizio per la propagazione delle febbri.

Nessun passo innanzi ha fatto la questione dei *rapporti, pur così intimi, fra colture di barbabietole e malaria.*

9. — Altre cause predisponenti o non all'epidemia di malaria.

I *rapporti fra climatologia e malaria* restano sempre oscuri, e tali rimarranno fino a che i fenomeni meteorologici per una serie di anni non possano esser messi, e isolatamente e complessivamente, a confronto delle infezioni sicuramente primitive e di quelle sicuramente recidive.

A Vigasio, per esempio, tra recrudescenze epidemiche e variazioni atmosferiche, giorni piovosi e burrascosi, non fu osservato quello stretto legame che qualche anno fa sembrò evidente.

Come fu più volte antecedentemente ricordato, fu l'anno scorso precoce l'estate.

---

(1) In questo senso le stalle possono fino a un certo punto difendere le abitazioni soprastanti dalle invasioni delle zanzare.

(2) Bullettino dell'Ufficio del lavoro, vol. III, n. 1, gennaio 1905.

Ad esempio, qui a Roma si ebbe:

Aprile	1ª	decade	temperatura	massima	16°.70 C.
Id.	2ª	»	»	»	22°.35 »
Id.	3ª	»	»	»	19°.66 »
Maggio	1ª	»	»	»	20°.84 »
Id.	2ª	»	»	»	24°.16 »
Id.	3ª	»	»	»	27°.05 »

E poi, secondo Millosevich (1), l'eccesso di temperatura diurna sui valori normali diurni per le decadi di giugno e luglio e per la prima quindicina d'agosto fu il seguente:

Giugno	1ª	decade	+ 2.1	C.
Id.	2ª	»	+ 1.0	»
Id.	3ª	»	+ 1.4	»
Luglio	1ª	»	+ 0.8	»
Id.	2ª	»	+ 1.9	»
Id.	3ª	»	+ 1.5	»
1ª quindicina d'agosto			+ 1.8	»

Dai quali numeri si impara che considerato il periodo dal 1° giugno al 15 agosto, cioè di 76 giorni, la prima decade di giugno fu eccessivamente calda, e lo furono in diversa misura tutti gli altri periodi. La giornata più calda fu il 14 agosto con una differenza in eccesso sul valore normale di ben 3°.7 e in ritardo di ben 22 giorni sopra la giornata più calda normale a Roma, che è il 22 luglio.

Il massimo assoluto di giugno fu 31°6 il 29; quello di luglio fu 34°.5 il 19 e nella prima quindicina d'agosto ebbesi pur 34°.5 il 13. Dalle poche cifre soprascritte si trae la conclusione che, per la lunghezza e per l'eccesso persistente della temperatura diurna sopra il corrispondente valore normale, l'estate del 1904 va classificata fra le più calde, anche se i massimi assoluti non raggiunsero valori estremi o li raggiunsero in ritardo.

Con la precocità e lunga durata del caldo anticiparono i raccolti e le relative lavorazioni campestri.

E tuttavia, come fu detto più sopra, non anticipò, dove fu potuto osservarla scrupolosamente, l'epidemia propriamente detta, cioè delle nuove infezioni primitive.

Anticipò invece la recrudescenza preepidemica e intraepidemica delle recidive, e ciò forse in ragione dell'anticipo dei lavori campestri e dei relativi disagi, predisponenti alle recidive stesse.

Come al solito *fu netta la correlazione fra la fine dell'epidemia e l'abbassamento della temperatura* e le contemporanee pioggie precoci per tutta l'Italia anche più meridionale (Calabria, Isole).

---

(1) *Tribuna*, 16 agosto 1904.

A lor volta le *condizioni economiche* mostrarono sempre una preponderante influenza, tantochè eziandio in alcuni comuni del Mezzogiorno la minor diffusione e gravezza ch'ebbe la malaria nell'anno scorso fu, con molto fondamento di verità, attribuita all'accresciuto benessere consecutivo all'emigrazione e al denaro rimandato in patria dagli emigranti.

Similmente fu analizzato a Vigasio *il benefizio economico che dalle varie colture deriva alla mano d'opera.* Questa riceve:

Per le risaie	L.	174	per ettaro
Id. la barbabietola	»	55	id.
Id. i fieni	»	54	id.
Id. il frumento	»	50	id.
Id. il sorgo	»	45	id.

Sicchè la coltura del riso porta con sè il maggior profitto alla popolazione rurale avventizia, onde è anche possibile un miglior nutrimento, un miglior vestiario e un maggior consumo di chinino. Queste condizioni insieme ad altri fattori epidemiologici ignoti, e ad un certo grado di immunità acquisita per malaria sofferta, devono potentemente aver contribuito ad attenuare l'epidemia dove, anche permanendovi la risaia, l'agricoltura è più rimunerativa, e dove, in genere, al latifondo succede la coltura intensiva.

PARTE II.

Profilassi della malaria.

Anche nel 1904 fummo occupati a mettere in prova e studiare isolatamente e comparativamente la cura radicale delle febbri recidive; la cura preepidemica dei malarici residuali delle anteriori epidemie; la profilassi medicamentosa, meccanica e mista; la distruzione delle zanzare; le bonifiche idrauliche e agrarie.

Riferirò prima i risultati ottenuti, e poi ne ricaverò dei corollari intorno alla nostra legislazione antimalarica, all'ordinamento del relativo servizio sanitario, e ai vantaggi economici d'una ben organizzata lotta contro questa epidemia

A. — Chinino di Stato.

Fu accolto come una vera benedizione dalla nostra gente rurale, perchè in ispecie nella sua forma di confetti soddisfa a tutti questi postulati:

Qualità ottima; purezza garantita; dosaggio preciso; conservazione eccellente; forma e somministrazione aggradevole e facile; assimilabilità perfetta; prezzo minimo pel pubblico e pronto acquisto in ogni angolo ove sia una rivendita di sali e tabacchi; prezzo di favore per chi vuole o deve distribuirlo gratuitamente ai lavoratori in zona di malaria; grande efficacia curativa e preventiva contro le febbri.

Per tanti pregi indiscutibili e riconosciuti ormai da tutti, eccetto che dagli interessati industriali, il grande rimedio di Stato, ovunque arriva, diminuisce subito e poco a poco finisce per vincere quell'avversione al chinino ch'era antica in molte delle nostre popolazioni di campagna.

Il chinino di Stato, com'è noto, si prepara dalla farmacia militare centrale, ed è messo in vendita nelle farmacie e negli spacci di sale e tabacco dal Ministero delle Finanze (Direzione generale delle privative) sotto queste forme:

a) tavolette di bisolfato di chinino da 20 centigrammi l'una, e ogni 10 chiuse in tubetti;

b) confetti di bisolfato e idroclorato di chinino da 20 centigrammi l'uno, e chiusi o in tubetti, come sopra, per la vendita al pubblico, ovvero in scatole per le amministrazioni pubbliche e private;

c) fiale sterilizzate di idroclorato con etiluretano (formola del Gaglio) e di bicloruro di chinino.

Dei *preparati per l'iniezione ipodermica di chinino* si è con nuove ricerche interessato il prof. Gaglio studiando la soluzione di bicloridrato comparativamente con la sua felice c ben nota formola di idroclorato con etiluretano (1).

Una serie di lavori, comparsi in questi ultimi tempi metteva in dubbio che i sali di chinino, iniettati sotto cute, si assorbissero più rapidamente che per la via intestinale, anzi tendeva a dimostrare che la chinina precipitasse nel punto di iniezione e comparisse quindi più lentamente nelle urine.

Questi inconvenienti sono reali; ma si devono all'uso del bicloridrato che, oltre a ciò, essendo molto acido caustica i tessuti, e perfino può necrotizzarli, onde ingorghi, infiltrazioni, indurimenti e financo escare, assai moleste, dolorose e talora lente a guarire.

Invece *il cloridrato di chinina con etiluretano, oltre essere solubilissimo ha reazione lievemente alcalina, non caustica i tessuti dai quali anzi è tolle-*

---

(1) La formola del Gaglio viene, per merito del Baroni della farmacia centrale militare di Torino, preparata in modo che non viene ad alterarsi a nessuna temperatura intermedia fra la sterilizzazione a 112° C. nell'autoclave e lo zero a cui può eventualmente arrivare conservandola di inverno.

rato meglio di ogni altra preparazione; non è perciò dolorifico; inoltre è diffusibile e non precipitabile dagli alcali organici.

E' notevole la rapidità con la quale si compie l'assorbimento del cloridrato di chinina con etiluretano, a differenza di ciò che avviene pel bicloridrato.

Purtroppo ancora dai medici specialmente nell' Italia meridionale si abusa delle iniezioni ipodermiche di chinino bicloridrato.

E' quindi a far voti che il diffondersi dell' uso preventivo e curativo dei confetti di chinino di Stato riduca il bisogno delle iniezioni, e quando queste occorrano, sia perchè in realtà l'assorbimento intestinale è mal sicuro, sia perchè necessita una pronta energia terapeutica, *si scelga la formola del Gaglio* che a quest' ultima condizione risponde meglio di ogni altra finora adoperata.

***

La *ricerca di un chinino non amaro, ad uso specialmente dei bambini*, condusse già alla fabbricazione dei confetti di chinino di Stato, oramai diffusi in tutta Italia.

Pei bambini però sotto i 3 anni e talora anche più in su, come anche per qualche adulto, la deglutizione dei confetti non è facile e certe volte non è possibile.

I nostri chimici-farmacisti Martinotti e Castellini, così intelligenti e attivi preparatori del chinino di Stato, da vari anni si occupano con grande amore e zelo della soluzione di questo problema assai interessante per la profilassi e la cura della malaria.

Essi prepararono parecchi sali di chinino fra i meno solubili, e li esperimentarono prima coll'assaggio diretto, poi accoppiandoli al cioccolatto solo o sovraddolcito colla saccarina, o col cristallosio, o con lo zucchero.

Di tutti i sali meno amari fu scelto il *tannato*, del quale si perfezionò la preparazione per averne un sale di composizione costante affatto insolubile in acqua e perciò senza sapore. Con questo sale si apprestarono cioccolattini (1) del peso di gr. 6 circa, che contengono 1 gr. di tannato (pari a gr. 0. 32 di chinina anidra, corrispondente a poco meno di mezzo gr. di solfato di chinina), e sono opportunamente divisi in 2 metà, per poterne frazionare la dose. Sono facilmente

---

(1) Si sarebbero venduti al pubblico a soli 10 centesimi il grammo di chinino che contengono, e a 8 centesimi per le pubbliche Amministrazioni. Il cioccolatto, materia così nutriente, verrebbe ad essere gratuito in rapporto al prezzo a cui si vende il chinino di Stato in tabloidi o in confetti.

mangiati dai bambini che non sempre si accorgono di un sapore leggermente e non sgradevolmente amarognolo che resta *in fundo* di questi falsi dolci.

Bisognava però controllarne l'assorbimento e l'azione profilattica e terapeutica.

Quanto all'*assorbimento*, per quanto fosse già noto che il tannato si assorbe, pure il dott. E. Modigliani, sotto la direzione del professor Gaglio, ha voluto esperimentarlo su di se stesso e su 2 bambini di 3 ½-4 anni.

Si potè così confermare che il *tannato di chinina si assorbe*, ma lentamente e non completamente, nel senso che un quinto circa ne passa inassorbito per le feci. Perciò bisogna somministrarlo in maggior dose che gli altri sali, quando si domanda un'azione pronta; e invece si mostra *particolarmente indicato quando è utile un'azione lenta e duratura della chinina*, così, cioè, nella malaria cronica e recidivante, come nella profilassi.

Adattatissimo poi è quando alla malaria si complica un catarro intestinale, perchè allora agisce favorevolmente anche l'acido tannico del cioccolatto e del tannato di chinina.

A controllare e consolidare le esperienze di laboratorio parecchi nostri soci ebbero i cioccolattini di chinino di Stato per usarli a scopo terapeutico e profilattico.

Fu unanime il loro responso.

I cioccolattini di chinino sono sempre accolti con gioia dai bambini; sono facili a somministrarsi e a deglutirsi; oltre al valor nutritivo, hanno benefico effetto sui disturbi gastro-intestinali, ottimo successo profilattico, e un effetto terapeutico pronto e sicuro alla dose piuttosto alta di 2-6 cioccolattini al giorno.

Senonchè, le suaccennate ricerche sperimentali ed osservazioni cliniche non bastarono perchè il Consiglio superiore di sanità ne approvasse la preparazione e la vendita per la prossima campagna antimalarica (1).

E' nostro dovere perciò d'accumulare altre ricerche ed osservazioni cliniche durante la stagione epidemica che ora si apre. Così il supremo Consesso, che attende nuove prove, non potrà negare il suo favorevole giudizio a un preparato che *pei bambini* non può essere

---

(1) Non è qui il luogo di discutere l'ordine del giorno col quale il Consiglio superiore di sanità precipitò il rigetto dei campioni di cioccolattini di tannato di chinino, motivandolo con asserzioni non provate e giudizi inesatti.

fin'oggi sostituito da altro migliore, e non vorrà quindi più a lungo toglierci un'arma, la più potente che abbiamo per attaccare le infezioni così ostinate nella tenera età e così pericolose per tutta la popolazione.

Nei casi di imbarazzi dello stomaco per febbre o per altre malattie, quando è più difficile la solubilità gastrica del chinino, sono in preparazione anche i *confetti di bicloridrato di chinino dello Stato.*

Di simili confetti facemmo già un largo ed utilissimo uso durante la campagna profilattica del 1902.

B. — Cura radicale delle febbri recidive.

Tutti i nostri soci ormai, dopo matura esperienza, sono persuasi che *per vincere l'infezione malarica il chinino in genere, quello dello Stato in ispecie, val più e meglio di ogni altro rimedio.*

Basta somministrarlo lungo tempo, perchè i poteri ematogeni dell'organismo, generalmente senza bisogno d'alcun soccorso d'altro medicamento, rimettano l'individuo nella primitiva salute, sostituendo il color naturale a quello terreo pallido, diminuendo e perfino annullando il tumor di milza.

Cosicchè *con un po' di pazienza e perseveranza anche le infezioni croniche cedono all'azione del solo chinino.*

Nei bambini invece, a causa delle preparazioni chinacee oggi in uso e per essi inadatte, la cura non può essere finora così completa come negli adulti; onde il loro più ostinato recidivare.

Parecchi dei nostri soci forniscono però le prove che il solo chinino agisce efficacemente, se regolarmente preso, anche per combattere e vincere l'anemia e la cachessia malarica nei bambini; anzi, in questa età i poteri ematogeni, sottratta la causa specifica che li paralizza, riprendono ben presto la loro funzione.

Per esempio, il dott. Pezza (Mortara) ci ricorda un bambino di 2 anni, infermiccio dalla nascita, con febbricole intermittenti, tumor di milza, color cachettico, continuo piagnucolio.

Dopo iniziata la cura chininica quotidiana, secondo il mio metodo, l'effetto fu meraviglioso: cessarono le febbri, si ridusse il tumore splenico, il color bruno naturale prese il posto del giallore; il bambino divenne vispo, e i genitori credettero a un mezzo miracolo di risurrezione.

Onde la *necessità urgente di mettere pei bambini in commercio preparati aggradevoli e di mite costo, come i cioccolattini di chinino di Stato.*

Nuove osservazioni si sono aggiunte al patrimonio già da noi accumulato negli anni precedenti per dimostrare la poca o assai dubbia *efficacia dell'arsenico e del ferro associato e mescolato col chinino.*

Una grande esperienza comparativa fu quella sul litorale austriaco ove alcuni medici usarono il solo chinino, altri chinino e arsenico, altri chinino, arsenico e ferro, in confetti preparati sempre dallo Stato.

Orbene nessuno potè dimostrare la supremazia dei preparati misti; alcuni ebbero dal solo chinino il miglior effetto profilattico e tonico; altri eziandio nella malaria cronica ebbero miglior risultato terapeutico dal solo chinino anzichè dalla sua mescolanza con arsenico.

Anche l'ispettore sanitario dott. De Celebrini assicura che lui stesso nelle sue escursioni attraverso i paesi curati, osservando i malarici nei diversi periodi di cura dovette persuadersi che le sindromi concomitanti la malaria, e specialmente l'anemia, migliorarono presto con l'uso del solo chinino.

Una piccola esperienza comparativa fu eseguita ad Olevano Lomellina, per suggerimento di Grassi (1) dai dottori Valenti e Pezza. Non si potè per varie ragioni arrivare a una conclusione sicura; ma certamente non tutti rimasero convinti che le costose miscele meritassero la preferenza sopra il semplice, economico ed efficace chinino di Stato.

Anche a Pontepossero e Uniti si sono (2) ormai dopo 3 anni di prove comparative persuasi che le miscele chinino-ferro-arsenicali agiscono e valgono pel chinino, che vi si contiene e che basta da solo.

Notisi poi che quando si usano miscele chinino-arsenicali, dopo ingerito il medicamento, abbastanza spesso insorgono disturbi gastrici, e poi si manifesta non di rado un vero esantema arsenicale sotto forma di acne, papule e persino pustole. Onde la profilassi o la cura specifica devono subire interruzioni.

Due sono com'è noto *i metodi per somministrare il chinino per la cura radicale della malaria latente e recidivante*, cioè:

a) *metodo discontinuo* o periodico, a dose terapeutica (grammi 1) ogni 7-9-10 giorni (Koch) per due giorni di fila, ovvero ogni 4 giorni mezzo grammo (Ziemann), e sempre per 2 mesi di seguito.

A sua volta il Carducci, tenendo conto che le recidive, secondo egli ha osservato, accadono ogni 7 giorni, ma ogni volta 2 o 3 generazioni parassitarie febbrigene possono succedersi, propone dar chinino nel 1°, 2°, 3° giorno di apiressia, poi nel 4° giorno nulla, e poscia nel 6°, 7°, 8° giorno, e successivamente nel 13, 14°, 15° giorno e così di seguito per tre volte la settimana.

---

(1) *Relazione dell'esperimento fatto nel* 1904 *nel podere Drovanti*. Agricoltura Moderna, 1905.

(2) Dott. Polettini. *La malaria nel podere Ponti nell'anno* 1904. Verona, 1905.

In 60 casi i risultati di questo metodo furono buoni; devesi così però continuare mesi e mesi, altrimenti sospendendo l'uso del chinino la recidiva può riaffacciarsi,

b) metodo continuo e quotidiano (Celli) a dosi medie (40-60 cgr.), (la metà nei bambini) per 40-60 giorni; aumento della dose fino a quella terapeutica (grammi 1-2) subito dopo ogni nuovo accesso, che eventualmente si riaffacci, proseguendola per qualche giorno (3-5) e poi tornando alla media dose quotidiana.

Con questo metodo, di assai facile esecuzione, si riducono al minimo possibile e si troncano più agevolmente le recidive; oltrechè per la continuata presenza del chinino nel sangue circolante è meglio allontanato il pericolo dell'attecchimento di nuove infezioni per nuove punture (pseudo-recidive).

Ad esempio a Vigasio nel 1903 furono così curati 330 recidivi, dei quali recidivarono nel 1904 soli 50 (15. 15 %); rispettivamente non si poterono curare 483 malarici e ne recidivarono 302 (62. 52 %). Similmente nel 1904 dal 25 agosto al 15 novembre, furono così curati 275 malarici, dei quali soli 14 (5. 07 %) recidivarono con soli 22 accessi di febbri che non costrinsero alcuno a letto. Frattanto, nello stesso periodo di tempo sopra 298 malarici non curati ne recidivarono 128 (42. 95 %) e molti soffrirono febbri abbastanza gravi.

Così a Massa Lombarda (1) di 234 energicamente curati come sopra, e sempre col chinino di Stato soli 23 (9. 82) %) recidivarono.

Disgraziatamente nelle zone di malaria grave la ostinatezza nel recidivare, e quindi la resistenza verso il chinino sono maggiori che nelle zone di malaria più lieve.

Ad esempio mentre nel Mantovano con la detta cura insistente è facile evitare le recidive, sia a breve come a lunga scadenza, invece nel Mezzogiorno può essere già un buon successo il poter abbassare fino al 20 % il coefficiente di recidività (vedi tabella IV a pag. 26-27).

C. — Cura preepidemica della malaria recidiva o latente.

Questa cura si è mostrata ancora una volta nel periodo preepidemico insufficiente a prevenire o a render più lieve la epidemia che succede fatale.

---

(1) Dott. Valenti. *Malaria e chinino di Stato*. Massa Lombarda, 1905.

Ciò si è, per es., verificato nel 1904 a Massa Lombarda (1).

Ed anche nel nostro esercito con tutta la cura settimanale di bonifica dei 2679 organismi, ritenuti malarici, durante il periodo preepidemico, poi si ebbero nei mesi di epidemia del 1904, 1368 primitivi.

Invece non nel solo periodo preepidemico ma, come io avevo proposto fino dal 1899, durante tutto l' inverno e la primavera si curarono intensivamente secondo il mio metodo i recidivi a Vigasio solo in parte per mancanza di chinino, e nell' Istria invece non solo i recidivi ma anche i sospetti.

Così a Vigasio nel 1904 di 156 recidivi, che fecero dal 1° gennaio al 25 agosto la detta cura, soltanto 4 (2.5 %) recidivarono.

Di 2690 malarici così trattati, nell' Istria si ebbero 241 (8.95 %) recidive, con reperto microscopico positivo solo nell'8-9 % dei casi.

Alcuni però nell' Istria ad onta della cura recidivarono, parecchi altri, i casi più lievi, sfuggirono alla cura.

Quindi è questo *uno dei modi, però non l'unico nè il principale* (2), se si vuol combattere un'epidemia: ed anzi per ridurre (annullare è impossibile) i serbatoi di infezione, che si trasmettono da un anno all'altro, bisogna per tutto l'anno invigiare e più e meglio che si può curare i recidivi.

D. — **Profilassi medicamentosa.**

Nel mio precedente rapporto feci voto che nel 1904 questa profilassi mediante il chinino di Stato si fosse potuta estendere sempre più conquistando il posto che nella pratica ormai le spetta.

E difatti si è molto estesa qui nell'Agro Romano, ove ebbe la sua culla, ed è penetrata in molte altre regioni d' Italia. In tutto nel 1902 furono profilassati 3055 individui, nel 1903, 19021, e nel 1904 più di 70,000.

(1) Loc. cit.

(2) In questo senso, troppo ottimista fu, com'è noto, patrocinato dal Koch. Il quale (Deuts. Medicinische Wochenschrift, 13 dicembre 1900) espressamente dichiarò che non ha niente che fare con la profilassi chininica. « La profilassi (egli notò) vuole impedire l' infezione dell' uomo sano ; egli voleva distruggere il parasita nell' uomo infetto : la prima dovrebbe estendersi a tutti gli abitanti in luogo di malaria ciò che nella pratica è impossibile (?) ; la cura mira a risanare le persone infette ciò che si può e si deve fare per ragioni umanitarie ». La pratica invece insegna, che rintracciare e guarire tutti gli infetti è, come sempre, più difficile che preservare i sani.

Così anche nei luoghi più incivili la nostra gente rurale, ignorante e attaccata ai vieti pregiudizi, potè toccare con mano che il chinino di Stato, in forma di confetti, fornisce a chi voglia un mezzo facile, aggradevole ed efficace a preservarsi dalle febbri; preso a dosi piccole o medie quotidiane secondo il mio metodo, non solo è senza danno alcuno sull'organismo, ma, invece, spiega un'azione tonica sullo stomaco e corroborante dei muscoli, i quali ultimi effetti preziosamente giovano a dar lena in mezzo agli strapazzi e ai disagi che accompagnano i lavori di campagna nell'epoca febbrile dei raccolti.

Non c'è che provare e far provare per convincersi e convincere che la profilassi quotidiana chininica non sconcerta neanche in minimo grado lo stato di sanità fisica e funzionale.

E quando può essere insinuata nel modo aggradevole dei confetti e dei cioccolattini *riesce agevole ed efficace in tutte le età.*

Ad esempio in Ostia per merito del dott. Maggi 20 bambini che da 3 anni seguono con fedeltà la profilassi chininica non hanno mai contratto febbre, e mostrano un aspetto sano e roseo quale non avevano mai i bambini in questa regione da secoli infeudata alla malaria.

C'è dunque da credere e sperare che quando oltre ai confetti si potranno diffondere per tutta Italia i cioccolattini, o qualche simile e gustosa forma di somministrazione del chinino, si potrà almeno stremare quel fato per cui ogni uomo che nasce e vive in luogo di malaria entro i 2-3 primi anni d'età deve inesorabilmente pagare alla febbre il tributo della malattia, e spesso della morte.

I risultati da me addotti negli anni antecedenti a sostegno della profilassi medicamentosa quotidiana avevano per alcuni il fondamentale difetto d'essersi ottenuti in annate, nelle quali la malaria era in una fase di spontanea diminuzione.

C'erano, è vero, i controlli a parlar chiaro delle differenze tra chi faceva o non la profilassi chininica. Ma, senza dubbio, *la recrudescenza epidemica dell'anno passato è giunta in tempo a persuadere anche i più scettici dell'efficacia indiscutibile di questa profilassi medicamentosa mediante il chinino dello Stato.*

La tabella III mostra a chiare cifre come *nell'Agro Romano* la profilassi chininica da poco più che un migliaio di persone si è estesa in 4 anni a circa 30,000 persone, e ormai *qui può dirsi entrata nelle abitudini della vita di campagna.*

TABELLA III.

	1900	1901	1902	1903	1904
Totale dei profilassati nell'Agro Romano.	...	1,176	3,853	17,506	29,693
Numero di infezioni primitive curate dalla Croce Rossa.	1,716 (17 %)	1,263 (16 %)	764 (7 %)	320 (2 %)	162 (1.3 %)
Numero dei malarici ricoverati negli Ospedali di Roma.	6,186	4,752	2,750	2,461	2,961

Man mano che acquistava terreno ne perdettero le infezioni primitive registrate dai medici della Croce Rossa (v. tabella III) e che nel 1904 si ridussero appena ad 1. 34 % della popolazione chininizzata (12,061 persone). E frattanto il grande osservatorio della malaria, negli Ospedali di Roma, ha registrato che dal 1900 in poi la epidemia fu sempre più mite, e tale rimase anche nell'anno scorso ad onta ed a dispetto della recrudescenza epidemica generale e locale.

La curva della fig. 2 conferma che l'epidemia del 1904 desunta dal numero dei febbricitanti accolti negli ospedali fu notevolmente più lieve che la media dell'ultimo dodicennio.

Dopo il Comune della capitale, che è veramente d'esempio a tutta quanta l'Italia malarica, viene la *provincia di Roma*, dove per l'attività del medico provinciale la profilassi fu potuta introdurre e intensificare per mezzo dei nostri cosidetti campi dimostrativi o sperimentali, a beneficio di circa 10,000 persone; vengono poi i *Comuni di Milano, di Mantova* con alcuni comuni di questa provincia stessa per merito della Deputazione e del medico provinciale; vengono *Vigasio*, sempre alla testa dei comuni del Veronese, *Mortara* con qualche comune della *Lomellina* ove, durante la monda, fu dalla Direzione generale di Sanità estesa la profilassi clininica a circa 15,000 mondariso, e qualche comune del *Vercellese* per merito della locale associazione dei Medici condotti.

Nel *Mezzogiorno* e nelle *Isole* per l'applicazione integrale delle leggi sul chinino gratuito s'incontrano grandi ostacoli che furono aumentati dall'intempestiva ordinanza di Sanità che vietava i nostri tentativi di popolarizzare, mediante esempi e fatti, la benefica profilassi. Con enormi sforzi riuscimmo però a far godere a quasi 4000 individui il frutto di un lungo lavoro profilattico preparatorio.

Anche per tutta la *rete adriatica* e in ispecie nei suoi riparti del Mezzogiorno, fu dato fin dal luglio 1904 il più largo possibile sviluppo alla profilassi chininica per tutte quelle persone che non hanno casa protetta dalle zanzare, o che per ragioni di ufficio non possono usufruire della profilassi meccanica personale o domestica.

TABE

Profilassi medicament

LUOGO dove fu applicata la profilassi	Preparato usato	Dose giornaliera di chinino cgm. (a)	Durata del trattamento	Persone profilassate	Malarono di recidiva	%	Malaro di primiti
Pezzana Vercellese . . .	Confetti di bisolfato di chinino di Stato (b)	20-40	Luglio-novembre	278	3	2.2	
Candia e Langosco . . .		20	Giugno-ottobre	509	8	3.6	..
Mortara		20-40	Giugno-novembre	786	10	1.3	
Vigasio veronese		»	25 sett.-15 nov.	896	22	2.4	1
Mantovano		»	Agosto-ottobre	477	..	..	..
Milano		»	Id.	3,534	..	..	..
Carpi		»	Luglio-ottobre	328	..	..	..
Grossetano		»	Id.	244	..	..	..
Provincia di Roma . . .		»	Id.	39,063	2,955	20.7	1,11
Rete adriatica meridionale		»	Id.	2,616	263	10.1	16
Mezzogiorno e Sicilia . .		»	Id.	3,933	..	..	..
Sardegna		»	Id.	26	..	..	..
			Totale nel 1904 . . .	**52,690**	..	..	..
			Totale nel 1903 . . .	**19,021**	..	..	..
			Totale nel 1902 . . .	**3,055**	..	..	..

(a) Per gli adulti (la metà pei bambini). — (b) Solo le ferrovie adriatiche usarono confetti di

il chinino di Stato.

	Malarono in totalità	%	Controllo %	Osservatori	*OSSERVAZIONI*
7	4	1.4	6.4	Dott. Vaccino Achille. .	Cominciati a profilassare in giugno 48, in luglio 136, in agosto 94.
	8	3.6	9.7	Dott. Omodei Zorini e Velasco	89 profilassati per tutta la stagione, gli altri per la monda.
8	16	2.0	8–69	Dott. Pezza	719 mondariso, 29 avventizi dell'ara, gli altri contadini stabili.
4	35	3.9	42.9	Dott. Polettini.	Altri 500 circa fecero la profilassi a proprie spese.
	20	4.2	51 2	Dott. Soliani ed altri . .	
	161	7.7	13.3	Ufficio d'igiene.	52 fecero la profilassi per tutta la stagione.
	2	0.6	..	Dott. Tusini.	Sani 263, già malarici 65.
	6	4.3	..	Dott. Mori	Tenuta di Castel della Pietra.
	3,072	7.8	..	Dott. Ravicini, Croce rossa, Ufficio d'igiene, ecc.	Profilassati dai medici del comune di Roma 17054, dalla Croce Rossa 12,061, dalla Società contro la malaria 578 per un periodo da pochi giorni a 5 mesi.
	426	16.3	..	Dott. Ricchi, ecc. . . .	In moltissimi altri la profilassi fu mista.
	512	13.2	30-80	Dott. Martirano e vari ufficiali sanitari.	
	..	..	75	Dott. Lay.	
	4,262	**8.0**	..		
	932	**5.6**	..		
	235	**7.7**	..		

La tabella IV ci dimostra che nell'Italia a malaria più mite la profilassi chininica fu più efficace che nel Mezzogiorno e nelle altre zone a malaria più grave.

Il che deve dipendere sia dalla già ricordata virulenza maggiore degli emosporidi, sia da altre ancora ignote ragioni epidemiche predisponenti, sia da più numerose difficoltà che nell'applicare la detta profilassi s'incontrano nell'Italia più malarica.

Naturalmente dalla profilassi chininica, come da ogni altra profilassi, sarebbe assurdo il pretendere il 100 per cento dei risultati favorevoli (1).

E' già molto quando si può, come nel caso nostro, *ridurre assai il pericolo della primitiva e recidiva infezione anche in luoghi ed anni di malaria grave.*

Ciò che l'esperienza profilattica del 1904 ci conferma essere possibile pur che si voglia.

Difatti la tabella IV ci dice che *di 52690 profilassati si ebbero 4262 casi di malaria, cioè in tutto appena 8.08 %, in un anno di malaria grave come il 1904.*

Si comprendono poi tutte le difficoltà che incontra, nell'estendersi in grande, un metodo profilattico che esige per lungo tempo la assidua e regolare collaborazione degli individui, per lo più sprovvisti di ogni educazione igienica e di ogni idea di previdenza.

Tant'è vero che dove fu applicata con più scrupolosa diligenza e per tutto il periodo epidemico ivi furono minori i casi di febbre.

La tabella succitata poi, e insieme l'unanime consenso di tutti i nostri soci vengono a confermarci che *questa profilassi chininica diminuisce notevolmente le recidive, anche nelle regioni di più grave epidemia, fa scomparire la perniciosità, previene la cachessia, impedisce molto spesso le primitive infezioni e in ogni caso rende più miti gli accessi e più facili a guarire, se aumentasi per pochi giorni la dose del chinino.*

Cosicchè il mio metodo profilattico, estendendosi ed entrando nella grande pratica di campagna, in un anno di grave epidemia come il 1904 ha conservato, se pur non ha accresciuto a contatto della realtà e fuori della sperimentazione limitata, il suo valore effettivo.

Anche *nell'esercito* con la diffusione sempre crescente dell'uso pro-

(1) Il dott. Panichi (Policlinico, sezione pratica, 1905) cita un caso nel quale si sviluppò l'infezione malarica e fu grave ad onta della profilassi chininica. E' però assai dubbio che questa fosse stata regolare ed assidua.

filattico del ch'nino si ottennero ripetute e progressive vittorie contro la malaria, tantochè nel 1904, come nei comuni ove la profilassi medicamentosa fu energica, non si avvertì la recrudescenza epidemica generale.

Difatti nell'ultimo quadriennio ecco qual fu l'andamento dei casi di malaria nell'esercito:

TABELLA V.

ANNI	Proporzione ‰		Osservazioni
	Soldati	Malati	
1901.	49.34	67.70	
1902.	36.52	46.20	Inizio della profilassi chininica.
1903.	22.69	24.14	
1904.	20.39	19.21	

Ed è ormai entrato anche nel campo sanitario militare il convincimento che alla chinizzazione discontinua sostituendo quella quotidiana, e così intensificando la profilassi chininica, si potrà menomare sempre più la funesta potenza di questo nemico della salute delle nostre truppe.

Ovunque poi si potè far *paragone del metodo continuo con quello discontinuo* i medici e i clienti si persuasero della miglior bontà del primo, oltrechè per più notevoli risultati preventivi, eziandio per minori disturbi che arreca all'organismo; cioè quasi tutti finiscono col tollerare benissimo la media dose quotidiana, mentre l'alta dose, settimanale, ogni volta riproduce i fenomeni di chinismo; pei quali, ad esempio, anche dei robusti soldati non sono in grado di montare la guardia.

In alcuni casi però è bastato trascurare 2-3 giorni la profilassi per vedere manifestarsi l'accesso febbrile che era latente; quindi anche il metodo discontinuo abbreviato dello Ziemann (ogni 4 giorni 1 gr. di chinino) per quanto superiore a quello settimanale pure non è preferibile al nostro metodo quotidiano.

In tutti i casi la profilassi chininica deve essere continuata per qualche tempo dopo cessato in autunno il pericolo di nuove infezioni, o dopo il ritorno in luogo salubre.

Per ciò il chinino di Stato si deve somministrare ai nostri lavoratori in tale quantità che possano continuare la profilassi durante il viaggio e nei primi 7 giorni dopo tornati in patria.

E' difficile determinare qual'è la *minima dose profilattica del chinino.* Naturalmente può variare secondo la virulenza dei parassiti, e quindi secondo i luoghi e i tempi di malaria grave o mite, oltrechè secondo le condizioni individuali. Perciò attorno i limiti della dose media di 40 centigr. al giorno dovrà essere lasciato al criterio medico locale cambiare alquanto la dose e il preparato, cioè scendere a 20 o salire a 60 centigradi, o invece del bisolfato adoperare l'idroclorato o il bicloridrato.

Ad ogni modo fra i 52,000 della tabella IV, i 15,000 mondariso, e quelli profilassati sotto le armi (1) e lungo le ferrovie, si può asseverare che *più di 70,000 individui fra la popolazione civile e militare furon nell'anno precedente sottoposti per un tempo vario da 10-15 giorni fino a 5 mesi di seguito alla profilassi chininica* quotidiana o intermittente.

Così rimasero luminosamente provate, *oltre la efficacia specifica, eziandio la innocuità quasi assoluta del larghissimo e lunghissimo uso profilattico del prezioso chinino di Stato.*

Anche nelle regioni del Mezzogiorno e di Sicilia dove più si temeva la *emoglobinuria* da intossicazione chininica questo pericolo non fu osservato dai nostri soci; il che viene a confermare quanto lo Ziemann (2), e l'Ufer (3) hanno pure osservato, che cioè con le piccole o medie dosi è più rara che con le grandi la comparsa di così spiacevole fenomeno.

Altri *fenomeni di intossicazione chininica,* qua e là osservati, furono:

urticaria anche scarlattiniforme, ed eritema vescicoloso, che però continuando la somministrazione del chinino scomparvero;

gastralgie e catarri intestinali, che apparvero per eccezione in seguito ad uso del chinino, mentre furono più frequenti dopo l'uso di miscele chinino-arsenicali;

avvelenamenti acuti nei bambini che per iscambio coi confetti ingerirono *molti* tabloidi zuccherati, che perciò devono essere tenuti e conservati bene in disparte.

La metrorragia e gli aborti di chinino (senza qui discutere se all'infezione si debbano anzichè all'alta dose del farmaco) sono un vecchio timore popolare che per le piccole e medie dosi profilattiche non può dirsi menomamente giustificato.

E. — **Profilassi meccanica.**

Non ha seguìto i rapidi progressi di quella medicamentosa. Difatto, per quanto a noi risulta, abbracciò 5851 individui nel 1902; 8230 nel 1903; 12,378 nel 1904 (v. tabella VI). Sempre però, ed in ispecie

---

(1) Il numero preciso non si è potuto avere.

(2) Archiv f. Schiffs-und Tropen-Hygiene. Vol. VIII, 1904.

(3) *Ueber fraktionirte Dosierung des Chinins bei der Behandlung der Malaria.* Inaugural - Dissertation, Muenchen, 1905.

lungo le ferrovie adriatiche, sicule e sicula occidentale ne furono confermati i pregi, ormai indiscutibili.

Invece lungo le ferrovie mediterranee, per mancanza di organizzazione, si è, negli ultimi due anni, riperduto quel che si era guadagnato nel biennio 1901-1902.

La protezione meccanica delle parti scoperte del corpo è, a causa dell'incomodo che arreca, sempre difficile a mantenere con regolare diligenza anche se gli individui, come guardie di finanza, carcerarie, ecc., sono pur sottoposti a disciplina e sorveglianza.

Ad onta però di tutte queste difficoltà inerenti all'umana imprevidenza ed apatia, *si è confermato che nella protezione meccanica premurosamente curata e opportunamente, come vedremo, integrata* con la profilassi chininica *sta per le ferrovie la fondamentale difesa contro la malaria.*

Si è confermato, difatti, che questa difesa meccanica esercita già di per sè un'azione benefica sulle recidive, e riduce al minimo numero le primitive infezioni. Tant'è vero che si ebbe sulle ferrovie adriatiche

	Prima della nuova profilassi	1901	1902	1903	1904
Per cento dei primitivi	38.71	2.0	1.29	1.03	2.33

la quale ultima cifra del 2.33 % di nuove infezioni si riconferma quale un successo indiscutibile in un anno di malaria grave come l'ultimo.

TABELLA VI.

Profilassi meccanica.

Luogo dove fu applicata la profilassi	Numero delle persone protette	Malarono di recidiva	Per cento	Malarono di primitiva	Per cento	Controllo	Osservatore	Osservazioni
Provincia di Verona. . . .	322	13	4.0	4	1.2	..	Dott. Polettini etc.	
Ferrovie Adriatiche	9,864	936	9.5	190	1.9	10,39	Dott. Ricchi etc.	Il controllo si riferisce ai soli lasciati indifesi in zone di malaria mite.
Id. Sicule.	1,564	118	7.5	46	2.9	20–27 %	Dott. Fontana etc.	
Ferrovia Sicula Occidentale.	628	17	2.6	8	1.3	..	Ing. Sbacchi	
Totale . . .	**12,378**	**1,084**	**8.7**	**248**	**2.0**			

Si aggiunga che sulle ferrovie suddette, all'impianto delle protezioni esisteva un indenne ogni 3, 5 infetti; oggi invece hanno il sopravvento i sani e i guariti.

Anche la durata dei singoli casi di febbre tra le persone difese è più breve che fra le altre; e la stessa semiprotezione, cioè pei soli alloggi del personale, come non si può far di meglio nelle stazioni, agisce favorevolmente sui famigliari non addetti al lavoro notturno.

Chi deve, perciò, vivere in luogo di malaria ed ha una casa o un ricovero, e non pensa a difenderlo e mantenerlo ben difeso dalle zanzare, senza dubbio rinunzia ad uno dei più sicuri mezzi di preservarsi dalle febbri.

Ma se questo mezzo riesce bene per gli agiati, pei ferrovieri, per le guardie di finanza, di bonifica, ecc., si è mostrato, come avevo previsto, sempre poco pratico pei contadini, che con la loro ignoranza e caparbietà hanno pochissima cura d'impedire l'ingresso alle zanzare, lasciando le porte o aperte o ad aprirsi di continuo dalle donne e dai bambini.

Questi inconvenienti sono più difficili a correggere nel Lazio e nel Mezzogiorno, ove, oltre a tutto ciò, la mancanza di abitazioni rurali e le abitudini di vita all'aperto, per isfuggire al caldo, nonchè la spesa non lieve per gli impianti e per le manutenzioni, limitano molto, finora, questa profilassi: la quale, però, dove si è nel 1904 estesa alle case rurali, come in Sicilia lungo la ferrovia sicula occidentale che ne dà il buon esempio, nella piana di Pesto, in provincia di Foggia, nel territorio di Toscanella e di Tivoli in provincia di Roma, nella colonia agricola di Alassio San Salvatore (piano di Colico)... ovunque ha fatto sì che aziende agrarie, prima infettissime, sono ora bonificate e vi si può far compiere, senza alcun disturbo, ogni lavoro agricolo che prima era interrotto o rallentato dalla malaria.

La spesa quindi si risolve in un'economia pei proprietari, che, pur tuttavia, sono restii a meritare e domandare quei premi in denaro, che la legge concede (1) a quei di loro che adottano nelle case private la difesa meccanica.

Occorre migliorare i sistemi di protezione eliminando, specie nelle finestre, ciò che ha l'aspetto di clausura, separando la cucina che dà fumo, dal resto dell'abitazione, come sulla ferrovia sicula occidentale, nonchè perfe-

(1) Ne furono concessi ai pochissimi proprietari: senatore Ponti, marchesi di Canossa e Ferraiuoli barone Balsamo, e ai fittabili della Cervelletta (Agro Romano, che li chiesero).

zionando i sistemi di chiusura automatica delle porte o dispensando premi ai diligenti e multe ai trasgressori.

Per diminuire le spese d'impianto e di manutenzione si possono adottare in parte le reticelle di filo; per conservare le reticelle di ferro bisogna usare vernice a base di gomma lacca e olio di ricino, e nei luoghi ad aria salmastra, che è così corrosiva, bisogna (Sbacchi e Manzella) usare una prima mano di vernice di piombo all'olio di lino, e una seconda mano di vernice a biacca color piombino.

Così con molta pazienza e con esempi di confronto, specie nei luoghi di malaria più grave, si può sperare che col tempo entri la profilassi meccanica nelle abitudini agricole, sempre, bene inteso, integrandola con la profilassi chininica per tutti gli obbligati a lavorare di notte o in altre ore pericolose.

F. — **Profilassi mista (chimico-meccanica).**

Contro un nemico tanto formidabile non si può rinunziare ad alcun mezzo di sicura difesa.

Perciò fin dal 1899 ho adottato e poi sempre consigliato combinare le sinergie della profilassi chimica e meccanica specie se e quando quest'ultima non è attuabile scrupolosamente.

Anche i fratelli Sergent riconoscono che in molti luoghi palustri e malarici non c'è da contare subito che su questa profilassi mista.

La quale per merito del senatore Ponti si è sempre più estesa a Portopossero e Uniti (1), dove prima del 1901 la percentuale dei malati era sempre del 30-50 %, e l'anno scorso, con tutta l'epidemia più grave scese al 13 %. Sono così divenute rarissime le perniciose; scomparse le cachessie; le infezioni estive sempre più rare, tantochè in poco tempo dalla malaria grave si è passati alla lieve.

Così pure in tutta la rete adriatica le due forme di profilassi sempre meglio armonizzate resero pressochè impercettibile nei suoi effetti l'intensità epidemica notevolmente accresciutasi nel 1904.

Difatti si ebbe lungo le ferrovie adriatiche:

---

(1) Loc. cit.

TABELLA VII.

	1888-1901 — Media	1902	1903	1904
Percentuale dei casi	69.92	44.93	30.32	33 10
Durata media dei casi	7.88	6 99	6.25	7.53
Perdita annua delle giornate di malattia per ogni agente.	5 48	3.12	1.89	2.43

E per tutti insieme gli agenti e i famigliari pochissimo più che una giornata si ebbe di malattia per malaria nell'ultimo anno!

Il consumo del chinino è intanto cresciuto da 147 kg. nel 1903, a 280 kg. nel 1904.

Per questo duplice beneficio profilattico, meccanico e chimico, era evidente, specie nel Mezzogiorno, il contrasto fra lo stato di salute del personale ferroviario e l'aspetto desolante delle popolazioni agricole nelle regioni malariche attraversate dalla ferrovia.

Anche nelle ferrovie sicule e nella sicula occidentale si è estesa la profilassi mista, aggiungendo cioè la profilassi chininica per gli agenti di fatica nelle stazioni di maggior traffico, il cui servizio non permette l'uso della protezione meccanica personale, e per gli agenti che abitano case in parte o per nulla protette.

Sicchè si può dire che *sulle ferrovie la difesa meccanica e chimica si completano a vicenda.*

Così deve dirsi per le guardie di finanza, di bonifica, degli scavi e delle carceri, ecc., pei carabinieri, pei cantonieri stradali e per tutti gli operai che dipendono direttamente o indirettamente dallo Stato e devono vivere e lavorare in luoghi malsani.

G. — **Distruzione delle zanzare.**

B. Galli-Valerio e I. Rochaz-De Jongh proseguendo le ricerche sulla biologia dei culicidi, confermarono che le loro uova possono svernare sotto il ghiaccio, come pure sul terreno e sulle foglie morte, e aggiunsero altri fatti.

Per esempio, delle vegetazioni palustri mentre la *lemna* è notoriamente sfavorevole allo sviluppo dei culicidi, il *ra. aquaticus* offre

ad essi un ricovero ricercatissimo perfino in acque correnti, ove le isole formate da questa pianta son veri nidi di anofeli.

La lista di animali acquatili, capaci di ingoiare larve e ninfe di culicidi deve essere aumentata; ad esempio, fra i pesci al *carassius auratus* si deve aggiungere il *cyprinus prasinus*; e possono entrambi essere utilizzati in vasche e laghi di giardino; il lisoformio grezzo vale, come il petrolio e il saprolo, a uccidere nelle acque i culicidi; *aspergillus glaucus*, e sopratutto *niger* hanno sulle larve specialmente di anofeli, un'azione distruttiva energica in laboratorio, ma non altrettanto in campagna.

Nel littorale austriaco si confermò la difficoltà, se non a dirittura l'impossibilità di risanare un luogo malarico mediante la petrolizzazione delle acque palustri.

Per esempio, sulle isole Brioni e nei dintorni dei forti di Barbarigo fu continuata la petrolizzazione, però senza ottenere un successo completo, sebbene le operazioni fossero eseguite con molta esattezza.

Sicchè venne ancora una volta confermato che la distruzione diretta di larve e ninfe di anofeli è impossibile o assai difficile effettuarla nelle grandi paludi; può rendersi, tutt'al più, utile nelle piccole paludi. Anche in quest'ultimo caso necessitano però una spesa notevole ed un'organizzazione che da noi è impossibile sperare.

Il cloruro di sodio o salgemma, abbondante in Sicilia, può essere un mezzo efficacissimo di profilassi locale.

Suffumigi e gaz insettifughi e insetticidi sono utili per scacciare le zanzare dalle case, p. es. all'epoca del nuovo impianto delle protezioni. Si aggiunga l'imbianchimento delle pareti per scoprire e uccidere le zanzare che arrivino a penetrare in casa.

La pomata di vaselina canforata al 10-20 % protegge, in ambiente chiuso, la pelle dalle punture di zanzare, ma all'aria aperta non più che per brevissimo tempo.

H. — Bonifiche idrauliche.

Ancora una volta, cioè per la Piana di Pesto, nel bacino inferiore del Sele, si è dimostrato che *bonificazione idraulica e risanamento igienico non sono sinonimi*.

Nella suddetta regione, classica per le antichità e per la secolare malaria una bonifica iniziata nel 1858 e regolarmente proseguita mediante colmate, arginature di fiumi, apertura di canali di scolo, con una spesa di quasi 6 milioni non è affatto riuscita a togliere la malaria.

Si è pensato quindi integrarla con la suddetta profilassi mista, che insieme con la bonifica idraulica ha dato prontamente salutari effetti nella plaga di Sardara in Sardegna.

Certamente ogni bonifica idraulica, nel corso della sua esecuzione può e deve essere oggi integrata con la profilassi mista. Questa dà tempo anche ad iniziare la bonifica non al piano, come troppo spesso finora si è fatto, ma in montagna e in collina, mediante cioè la preliminare e indispensabile sistemazione del corso superiore dei fiumi e torrenti.

Le quali ultime opere idrauliche che precedono e accompagnano l'imboschimento, e aboliscono le piccole paludi nel letto dei torrenti e dei fiumi, sono poi l'unica ed essenziale maniera di bonificare tante nostre piccole valli nel continente e nelle isole.

K. — Bonifiche agrarie.

Nella suddetta Piana di Pesto si è riconfermato che senza la consecutiva bonifica agraria ogni bonifica idraulica, sia pure ben ideata ed eseguita, lascia il territorio totalmente malarico.

Invece in molte provincie dell'Italia media adriatica e superiore il risanamento agricolo, dopo la bonifica idraulica, ha potentemente contribuito a far scomparire, o ridurre ai minimi termini la malaria che 30 anni fa era gravissima.

Oggi però possiamo e dobbiamo senza dubbio *abbreviare questi termini*, perchè le bonifiche idrauliche e agrarie, nel corso della loro esecuzione vengono facilitate di molto, e talora eziandio rese più rapidamente possibili, dalla sopraricordata profilassi mista.

Il miglioramento agrario porta con sè un aumentato benessere economico, e quindi un accresciuto consumo di chinino, un miglior vestiario, una migliore alimentazione.

' Ben a ragione alcuni proprietari intelligenti (sen. Ponti, dep. Cappelli) alla profilassi chininica o mista aggiungono una congrua alimentazione, sia mediante locande sanitarie o cucine popolari per gli operai avventizi nel tempo dei grandi lavori, sia mediante somministrazione di cibi sani e corroboranti alle famiglie coloniche.

Certo una buona alimentazione è più che tutto necessaria per coadiuvare il chinino a vincere le ostinate anemie da malaria.

J. — Legislazione sanitaria speciale contro la malaria.

Con la legge 25 febbraio 1904, fu concesso *a tutti i poveri* il benefizio del chinino gratuito, a spese dei Comuni, se e in quanto le Opere pie non hanno mezzi di provvederlo.

Si attende però ancora il regolamento che disciplini questa somministrazione per la quale non c' è limite o vincolo di zona o non di malaria.

A questo modo venne accolto il voto, ripetuto da nostri soci, per estendere il chinino gratuito a tutti della famiglia colonica, anche se non prendono comunque parte al lavoro agricolo, come i piccoli bambini ed i vecchi.

Con la legge 19 maggio 1904, fu sanzionato il principio che ad ogni e qualsiasi lavoratore in zona di malaria spetta il chinino gratuito preventivo, oltrechè curativo, a spese dei rispettivi padroni di terre, industriali e impresari di pubblici lavori.

Ancora però, dopo più che un anno, il regolamento relativo, con le *opportune e indispensabili istruzioni agli ufficiali sanitari* non vide la luce.

Si aspetta eziandio una legislazione sulle risaie che non ripeta gli errori fondamentali di quella vigente, e meglio segua le nuove idee sull'epidemiologia e profilassi della malaria, e concilii le esigenze dell'igiene con gli interessi di un'agricoltura così redditizia e così fruttifera anche alla mano d'opera.

Come pure si aspetta ed è urgente che si migliori e si coordini la nostra legislazione sulle bonifiche e sulle opere idrauliche.

Intanto agli effetti delle nostre leggi antimalariche la nave fu considerata dall'Ufficio di emigrazione come un qualsiasi Comune malarico, onde fu esteso il benefizio del chinino gratuito a tutti i nostri emigranti che partono o tornano da luogo infetto.

L. — Organizzazione della campagna antimalarica.

L'esperienza di questi ultimi anni ci ha dimostrato che per tutta Italia, dove più dove meno, i nemici delle nostre leggi antimalariche sono:

a) ignoranza, incoscienza, indolenza e imprevidenza delle nostre popolazioni rurali e in genere di tutti o quasi i nostri lavoratori;

b) incuria, apatia dei proprietari e affittuari di terre (con pochissime eccezioni), come pure degli industriali e impresari di pubblici lavori;

c) indifferenza e spesso contrarietà dei Comuni ai quali è per legge affidato anche questo, come ogni altro, servizio igienico-sanitario;

d) scarsa collaborazione e non di rado anche opposizione dei medici condotti o liberi esercenti;

e) mancanza di assistenza sanitaria nelle campagne più malsane, e più inospitali, lungi dall'abitato;

f) guerra spietata da parte degli interessi lesi dei farmacisti e degli spacciatori dei così detti specifici;

g) scarso appoggio o indifferenza della stampa medica e politica, con poche eccezioni;

h) di fronte a tutti i suddetti ostacoli organizzazione imperfetta e insufficiente della vigilanza igienica, dall'ufficiale sanitario al medico provinciale e all'ufficio centrale, che se pure sono preparati pei tempi ordinari di pace epidemica non arrivano più nei mesi di una guerra come quella contro la malaria così tumultuaria e disagevole anche per la calda stagione in cui si deve combattere.

A vincere, per quanto è più possibile, a mano a mano, i tanti ostacoli suddetti occorre:

a) *Propaganda educativa popolare*, con manifesti, opuscoli, e, più ancora, conferenze, conversazioni in dialetto, spiegazioni e dimostrazioni ripetute.

Da un lato i professori d'igiene, i medici provinciali e gli ufficiali sanitari, dall'altro i maestri, gl'impiegati governativi, provinciali e comunali, i carabinieri, i capi leghe hanno già fatto e più dovrebbero fare in avvenire. La nostra Società ha sparso migliaia di opuscoli di propaganda per mezzo del Ministero di Istruzione Pubblica, d'Agricoltura o delle Poste, dell'Associazione nazionale dei Maestri e dei Medici condotti, e lungo le ferrovie.

Di *Comitati locali antimalarici* qualcuno n'è sorto, p. es. a Cotrone, Eboli, Mortara, ma ce ne vorrebbero molti.

Ma per la nostra popolazione rurale un fatto solo vale più di ogni parola e di ogni ragionamento. Quindi è indispensabile una

b) *Propaganda di fatto.*

Per tale scopo niente giova meglio dei cosidetti *campi dimostrativi*, o d'intensificazione di lotta antimalarica.

Ammesso come indiscutibile che l'applicazione della legge del 19 maggio 1904 sul chinino *anche profilattico* non potrà farsi, nemmeno in qualche raro comune modello, se non quando il popolo e i medici saranno liberi da pregiudizi e ne avranno toccato con mano i grandi

vantaggi, ne sorge la assoluta necessità di cominciare ad applicarla a quella parte di contadini o di lavoratori che si lasciano più facilmente persuadere a provarla. Gli altri che non vogliono e spessissimo, per mancanza della quantità occorrente di chinino di Stato, non possono assoggettarsi alla profilassi chininica, per volere o per forza, rimangono di controllo, ma sempre però sotto la vigilanza medica, utilissima anche perchè è più pronto il soccorso del chinino curativo, appena si sviluppi la malaria in qualcuno che non può o non vuol prenderlo a scopo di prevenirla.

Questi campi dimostrativi o sperimentali analoghi a quelli che fu ed è necessario impiantare per convincere i contadini della utilità dei concimi chimici e della cura della peronospora, giovano più d'ogni altro modo a persuadere clienti e medici della bontà, innocuità ed utilità della profilassi così chininica come meccanica. Il senso d'invidia in quelli che, rimasti di controllo, ammalano, fa il resto; e così d'anno in anno cresce il numero dei volonterosi e convinti collaboratori e propagandisti.

Non fu quindi bene ispirato il Ministro dell'Interno, che, male interpretando le oneste e pratiche intenzioni della nostra Società, bruscamente faceva interrompere la benefica opera educatrice dei nostri campi sperimentali.

L'utilità di quei pochi campi che furono salvati dalla strage governativa venne riconosciuta da ogni uomo di buona fede.

L'esempio di tutti quei pochi comuni i quali incominciando da Roma e pure avendo chinino a esuberanza a poco a poco, anno per anno, estesero la profilassi medicamentosa, dimostra quanto è difficile trovare da principio chi voglia e possa regolarmente seguirla.

Profittare di questa condizione di cose per trarne il massimo profitto educativo e persuasivo, ecco qual fu ed è e sarà sempre lo scopo dei campi sperimentali, non già per dare una dimostrazione scientifica, ormai superflua, ma per vincere l'apatia, l'imprevidenza, i pregiudizi della nostra popolazione che, vivendo da secoli in luoghi di malaria, se non tocca con mano, non crede possibile di preservarsene così agevolmente, o limitarne i danni incalcolabili ch'è abituata a sopportare e a credere mandati dal cielo.

c) *Servizio sanitario antimalarico.*

Il medico non può arrivare dappertutto a distribuire il chinino, a vigilarne l'uso e a notarne i buoni effetti; egli deve essere perciò coadiuvato da studenti di medicina e farmacia, da vigili sanitari, infermieri, e così via, cioè da *assistenti o agenti antimalarici.*

Un apposito servizio sanitario è organizzato ormai dal 1900 qui nell'Agro Romano pei mesi di febbri, e quest'anno fu iniziato nelle miniere di Sicilia dalla benemerita Croce Rossa: analogamente si fa mediante un dili-

gente servizio medico civile, cioè non militarizzato, lungo il litorale adriatico austriaco.

La nostra Associazione nazionale dei medici condotti, sezione di Vercelli, è già entrata in questa campagna; così dovrebbe entrarvi anche l'Ordine dei medici. E' evidente il reciproco vantaggio della profilassi pei medici condotti e pei loro clienti operai o contadini: questi soffron molto meno delle febbri e delle loro conseguenze; quelli fanno meno visite.

Gli utili della vendita del chinino di Stato (v. tabella VIII) si impiegheranno anche a compensare, almeno in parte, la spesa di questo indispensabile servizio ausiliare antimalarico nei comuni più gravemente infetti.

Oltre a ciò i medici degli ospedali dovrebbero poter fornire chinino ai convalescenti, perchè continuino la cura delle recidive, sia tornando al lavoro e sia rimpatriando.

d) *Collaborazione dei proprietari, affittuari, industriali, impresari*, ecc.; tutti questi devono, per loro proprio tornaconto, benedire il chinino di Stato, e aiutarne la regolare distribuzione.

Chi sopraintende ai lavori ha tale influenza sui rispettivi operai o contadini che, se vuole, può con buona o mala volontà promuovere o distruggere l'opera di chicchessia.

Perciò si deve esigere la loro cooperazione, pena l'articolo 50 della legge sanitaria 22 dicembre 1888.

Una volta poi che la legge li obbliga di pagarlo il chinino, hanno tutto l'interesse che non si sperperi e se ne faccia il più utile uso preventivo e curativo.

Un agente di campagna, un capo fabbrica, un sorvegliante di lavori possono e devono, meglio d'ogni altro, organizzare in modo assiduo e preciso, sotto l'alta vigilanza del medico o di un suo collaboratore, il servizio della distribuzione dei confetti di chinino ai propri dipendenti.

e) *Regolare provvista del chinino di Stato*, specie nei mesi di epidemia, quando il prezioso farmaco non deve mai far difetto per nessuna ragione burocratica nè pel malvolere od incuria delle Amministrazioni comunali.

A tale scopo i comuni limitrofi potrebbero far capo ad un ente cointeressato nella campagna antimalarica, come i comuni del circondario di Vercelli vogliono riunirsi con l'Amministrazione dell'ospedale; ovvero si può come a Mantova *provincializzare* il servizio del chinino, con rivalsa sui comuni, che in bilancio hanno iscritte le somme per questa spesa obbligatoria, o direttamente sui più grossi proprietari.

Le provincie che sono in gran parte infette, come parecchie dal Lazio in giù e nelle Isole avrebbero tutto l'interesse di seguire il buon esempio di quella di Mantova.

f) Organizzazione provinciale della campagna antimalarica.

Il medico provinciale è in troppi altri servizi occupato per poter dedicare ad un solo la sua intiera attività in tutti i giorni e luoghi di epidemia. Guai poi se qualche altra epidemia più temuta gli sopravviene.

Occorre perciò di mettergli a fianco ed alla dipendenza uno o più *delegati antimalarici provinciali*, assunti in servizio temporaneo e scelti fra i medici che abbiano una speciale competenza nella nuova etiologia, epidemiologia e profilassi della malaria.

La propaganda fra i padroni e i lavoratori, fra gli amministratori e i sanitari, nonchè la vigilanza continua sui comuni e l'unificazione del servizio così necessaria per non elidere l'opera dei più diligenti, tutto ciò non è possibile, specialmente nelle provincie più infette, se non per mezzo di chi con l'autorità di tecnico, con la fede di apostolo, con la duplice qualifica di commissario della provincia e della prefettura per 3-4 mesi d'altro non si occupi che della guerra guerreggiata contro la malaria.

D'altra parte l'Amministrazione provinciale che dalla proprietà fondiaria trae i suoi cespiti ed ha tutto l'interesse di aiutarla a difendersi dalla malaria dovrebbe contribuire a compensare i delegati suddetti.

Delle tante spese sanitarie addossate alle provincie, nessuna più che questa è così consentanea alla natura stessa, come è utile ai fini dell'ente provinciale.

E il minore sperpero e la migliore utilizzazione del chinino per l'assidua e intelligente vigilanza sui comuni, compenseranno a esuberanza la piccola spesa che la proprietà fondiaria, per mezzo della sua legittima rappresentanza provinciale, si verrebbe ad assumere.

L'organizzazione provinciale contro la malaria è non meno, forse anzi più, necessaria che contro la pellagra; ma invece delle complesse Commissioni pellagrologiche permanenti, bastano uno o pochi delegati antimalarici temporanei.

E il fondo degli utili del chinino di Stato a nessun altro scopo più vantaggioso potrà e dovrà rivolgere una parte dei suoi proventi destinati appunto a diminuire le cause della malaria

Comunque *se non si organizza bene la campagna antimalarica, trascorrerà un lungo tempo prima di raccogliere su larga scala e su tanta parte del nostro territorio malarico quei grandi benefizi che già in alcune provincie stanno maturando, e che pel risorgimento economico e sanitario del nostro paese è così urgente affrettare.*

M. — Considerazioni statistico-economiche.

Giova anzitutto mettere a confronto il consumo del chinino di Stato con la mortalità per malaria in tutta Italia. E nell' istesso tempo è bene anche tener conto degli utili netti dell'azienda del chinino di Stato.

TABELLA VIII.

Consumo di chinino di Stato		Mortalità per malaria		Utili netti dell'azienda del chinino di Stato — Lire
Anno finanziario	Chilogrammi venduti	Anno	Totale morti	
...	...	1900	15,865	...
...	...	1901	13,358	...
1902-1903	2,242	1902	9,908	34,000
1903-1904	7,234	1903	8,513	180,000
1904-1905	13,645	1904	7,382 (a)	176,000

(a) Calcolata sullo spoglio delle schede di morte del 1° semestre e sulla relativa proporzione avutasi nell'ultimo triennio pel 2° semestre.

La tabella precedente ci dimostra che in 3 esercizi finanziari lo smercio del chinino è cresciuto in proporzione ascendente fino a quasi 13,000 chili. Frattanto dal 1900 in poi la mortalità per malaria è scemata precipitosamente fino a meno di 8000 morti nel 1904, che, per unanime consenso, fu di epidemia grave in così gran parte d'Italia.

Da quando la statistica sanitaria delle cause di morte viene diligentemente raccolta, cioè *dal 1887 la media di mortalità per malaria fu per un quindicennio sempre intorno ai 15,000, e non mai era scesa al di sotto degli 11,000 morti all'anno; invece dopo il 1902, cioè dopo il chinino di Stato è discesa rapidamente e progressivamente fin sotto alla metà della media suddetta.*

Il vantaggio economico della tanto scemata mortalità è di per sè incalcolabile.

Ma i felici risultati statistici ed economici sono più evidenti e si possono meglio valutare in quei comuni dove da vari anni si lavora a combattere la malaria.

A Roma, per esempio, si ebbero negli ospedali:

TABELLA IX.

ANNI	Giornate totali di degenza per malaria primitiva, recidiva e cronica	Medie individuali di degenza per malaria primitiva, recidiva e cronica
1899	50,371	
1900	64,661	10–27 giorni
1901	54,467	
1902	35,450	11–30 giorni
1903	32,509	11–28 giorni
1904	41,059	12–34 giorni

Cosicchè nel 1904 ad onta dell'accresciuta degenza media individuale dei malati, per la più assidua cura delle varie infezioni, il numero delle giornate totali di degenza fu poco più di 41,000; e la spesa del chinino, che il Comune, a conto dei proprietari dell'Agro Romano, fece per circa 40,000 lire, equivalente a circa 17000 giornate di ospedalità, fu ad esuberanza coperta e compensata da un'economia nel bilancio degli ospedali, senza contare il reddito della salute e del lavoro di tanti preservati dalle febbri.

A Vigasio Veronese, a Mantova, ad Argenta i nostri soci possono legittimamente vantarsi che per opera loro la continua progressiva diminuzione dell'epidemia non venne disturbata dalla recrudescenza del 1904, la quale, si noti bene, non venne avvertita neppure in quei già terribili focolai di malaria grave che nel Mezzogiorno erano Atella e Tuturano.

Anche le *grandi amministrazioni ferroviarie*, come quelle adriatiche, sicule e sicula occidentale possono vantarsi d'aver ricavato dalla nuova campagna profilattica, con una spesa relativamente lieve, un grande utile finanziario.

Ad esempio le ferrovie adriatiche, spendendo nel 1904 per chinino e altri medicinali ferro-arsenicali non più di lire 1.23 per ogni individuo dimorante in luogo di malaria, oltrechè estendendo la profilassi meccanica, fecero un ottimo affare, dappoichè questa epidemia costava ad esse per soli 1400 chil. della rete meridionale lire 1,050,000 all'anno (Ricchi) in più delle altre spese.

I benefizi economici della nuova profilassi possono valutarsi anche in ragione delle *giornate di lavoro che si risparmiano.*

Così l'epidemia del 1904 a Candia Lomellina col solo 4 % di attaccati fra la popolazione indigena potè valutarsi in lire 3891.

Nella bassa valle del Tevere in alcune tenute la perdita di giorni di lavoro per ammalato fu:

TABELLA X.

	Primitive	Recidive	Chinino consumato
Profilassi regolare	2.25	3.5	Grammi 4120.
Profilassi irregolare	5.33	12.0	
Nessuna profilassi	23.9		

Cosicchè le poco più di 240 lire impiegate in chinino furono rimborsate ad usura in tanta salute e in tanto lavoro.

Per la Sardegna fu calcolato in giorni di lavoro perduti e in spese per assistenza ai malarici non meno di 16 milioni il danno annuale della malaria; con poco più di 1,000,000 (lire 1,274,000) si potrebbero profilassare i 570,000 circa febbricitanti. Si farebbe dunque un guadagno enorme ad estendere ed intensificare la profilassi.

Si aggiunga che anche nelle terre più notoriamente pestifere è, *con poca spesa, possibile la regolare esecuzione dei lavori agricoli, industriali, ecc. anche nei mesi a giornate più lunghe e più redditizie*, quando prima bisognava interromperli o tirarli innanzi alla peggio e col sacrifizio di tanta salute e di tante vittime.

Dato dunque l'incalcolabile tornaconto economico dei padroni, ammesso come indiscutibile che la malaria è un infortunio sul lavoro e perciò spetta ai padroni prevenirne o risarcirne i danni ripagando ai comuni o direttamente fornendo il rimedio preventivo e curativo pei lavoratori, *non sarebbe nè equo nè morale che lo Stato desse il chinino a tutti gratuito come alcuni proposero*: ne verrebbe altresì a mancare la potentissima leva della cointeressenza di chi, obbligato a pagare il chinino, ha tutto lo stimolo per organizzarne e vigilarne la distribuzione in maniera da averne il massimo utile, col minimo sperpero; ed un alto problema di previdenza sociale si ridurrebbe a un atto di beneficenza pubblica, la quale ha già così esteso fra i poveri, aventi come tali diritto al chinino gratuito, la sua già troppo larga sfera di azione.

Da tutto ciò risulta come *la spesa per la profilassi chimica o meccanica o mista, e in ispecie pel chinino profilattico, si risolve in un ottimo affare pei privati, siano padroni o lavoratori, ed in un benefizio economico incalcolabile per la collettività.*

N. — Conclusioni profilattiche.

L'anno 1904 va ricordato fra quelli di intensa epidemia in ispecie nelle ragioni di malaria più grave.

Tuttavia la mortalità per questa infezione in Italia continuò la sua progressiva discesa parallela all'aumento progressivo del consumo di chinino dello Stato.

Si può quindi credere e sperare che finalmente l'Italia è sulla via di sdebitarsi dell'annuo e gravoso tributo di una mortalità, che si è ridotta quasi del 50 % (da 15,000 morti a meno di 8000) e che il potente specifico, sempre più diffondendosi, finirà col ridurre al minimo.

Opera più ardua e più lunga sarà quella di essiccar le sorgenti di un'epidemia così infiltrata nell'uomo, nelle zanzare e nell'ambiente.

A tale scopo è riservato un largo campo di attività ad ognuno dei modi profilattici suesposti, cioè: cura, per quanto possibile, radicale delle febbri: profilassi chininica, meccanica e mista; distruzione delle zanzare; bonifica idraulica e agraria.

Mentre però isolatamente presi, ognuno di essi può diminuire più o meno i malefizi della malaria, invece praticamente parlando sono i modi della bonifica umana che si dimostrano più pronti e più facili ad attuare, e quindi renderanno sempre più agevole, rapida, e talvolta financo possibile l'esecuzione delle bonifiche idrauliche e agrarie.

Così armonizzando fra di loro i modi di bonifica umana, idraulica e agraria, purchè ordinatamente si proceda, e fortemente si voglia, arriderà la vittoria definitiva sul nemico secolare del nostro territorio

Intanto, per parte sua, la nostra Società, col promuovere gli studi, le leggi, l'organizzazione e la propaganda, è lieta e orgogliosa di affrettare il risorgimento di sì gran parte d'Italia, che ora val poco, ma varrà moltissimo il giorno - più non lontano - in cui sarà liberata dal flagello della Malaria.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Sulla determinazione della umidità dei muri delle abitazioni

per il dott. **PASQUALE MAIONE**.

La determinazione della umidità dei muri delle abitazioni presenta serie difficoltà e non poche incertezze; per cui oggi possiamo dire ancora di non possedere nè un metodo, nè un sistema che ci conduca a conclusioni sicure.

I metodi fin qui proposti, per tale determinazione, si possono dividere in due classi: metodi empirici e metodi scientifici. I primi danno indizi appena sulla umidità delle abitazioni, i secondi la misura.

Quindi, alla prima classe appartengono: l' osservazione delle macchie sui muri, il senso di cattivo odore quando gli ambienti siano stati chiusi per vari giorni, la presenza di muffe, il suono chiaro che si può ottenere percuotendo i muri con un oggetto metallico, ecc. ecc.

Alla seconda classe appartengono i metodi coi quali si valuta il grado di umidità di un ambiente dallo stato igrometrico dell'aria contenutavi, oppure si misura l'umidità dell'aria aspirata attraverso le pareti, oppure ancora si determina la quantità di acqua contenuta in un campione medio dei muri dell'ambiente da esaminare.

La determinazione del grado igrometrico dell'aria degli ambienti per mezzo dei vari igrometri, vaporimetri o psicrometri non ci dà alcunchè di preciso, poichè cotesto grado igrometrico non è in relazione solo colla quantità d'acqua che può venire dai muri, ma anche e sopratutto colla umidità dell'aria esterna, colla ventilazione, colla temperatura, ecc.

E nemmeno precisi si possono dire i metodi con i quali si determina il grado di umidità dell'aria aspirata attraverso le pareti, sia facendo uso del cassone parallelepipedo di Beer (1), sia e peggio ancora dell'apparecchio Fortunato (2), nel quale l'umidità si determina con cartine al cloruro di cobalto.

Migliori risultati danno i metodi fondati sulla determinazione della umidità dei muri.

---

(1) Lehrbuch d. hyg. Untersuchungsmethoden, 1881, p. 495.
(2) V. Palazzo. *Lezioni di fisica applicata all'igiene*, 1891.

Tursini (1) approfitta dell'elevazione di temperatura che si manifesta mescolando il campione del muro con acido solforico di determinata densità. Questo metodo però è affetto dall' elevazione prodotta dalla trasformazione dei carbonati in solfati e perciò non dà che risultati approssimativi.

Markl (2) e De Rossi (3) approfittano della proprietà disidratante dell'alcool assoluto, determinando la densità dell'alcool dopo immersione del campione di muro, per mezzo di areometri in peso o galleggianti e conseguentemente calcolando la quantità d'acqua assorbita e sottratta al materiale.

Anche il metodo del Pagliani (4) è fondato sul potere disidratante dell'alcool, salvo che all'uso dell'areometro è sostituita la pesata diretta.

Glässgen (5), invece, trae profitto della evaporazione dell'acqua dal materiale ad una determinata temperatura e della conseguente diminuzione di peso. E questo metodo, considerato il più preciso di tutti quelli or ora accennati, ha servito e serve ancora come testo e sarà certamente in seguito quello che tutti sostituirà.

Nel metodo originale di Glässgen il materiale (20-25 gr.) si riscaldava e si seccava in un'anitra di Liebig. Lehmann e Nussbaum (6) modificarono l'apparecchio sostituendo all'anitra un tubo di cristallo e rendendo così possibili varie determinazioni contemporaneamente (ciascun campione di 2-3 gr.). In seguito Casagrandi (7) modificò ancora l'apparecchio di Lehmann e Nussbaum rendendolo più solido e sicuro, facendolo costruire di tutto metallo.

Altre modificazioni consistono nel favorire l'evaporazione dell'acqua dal materiale col calore e contemporaneamente col vuoto (Tursini, ecc.).

Per questa diversità di metodi e di criteri, e per la varia precisione di essi non si è ancora potuto conseguire un accordo circa i limiti massimi di umidità tollerabili sia nell'aria chiusa degli ambienti, sia nelle mura. Glässgen difatti dice tollerabile una umidità massima nei muri di 1 %; Lehmann e Nussbaum del 2 %; Abel (8) dall'1 al 2 %: Coggi (9), per Milano, del 3 %; De Rossi, per Pisa, dell'1.50 %.

Ma non è solo ai criteri ed ai metodi che deve attribuirsi cotesta disparità o discordanza nell'assegnazione dei limiti, ma anche alla modalità delle determinazioni ed ai vari materiali ai quali si sono trovati dinanzi i vari sperimentatori.

---

(1) Riv. d'Ig. e Sanità pubblica, 1891, nn. 4 e 5.

(2) *U. eine neue Methode z. Bestimmung der Mauerfeuchtigkeit*. Archiv f. Hygiene, Bd. 34, 1899, e Bd. 38, 1900.

(3) Questi Annali, 1900, t. X, p. 253.

(4) *Nuovo metodo per la determinazione dell' umidità delle pareti delle case*. Riv. Igiene e Sanità Pubblica, Torino, 1901.

(5) *U. d. Wassergehalt der Wände u. dessen quantitative Bestimmung*. Zeitschr. f. Biologie, Bd. XL, 1874.

(6) *Studien u. Kalkmörtel u. Mauerfeuchtigkeit*. Archiv f. Hygiene, Bd. IX, pag. 223.

(7) Questi Annali, XIII, p. 254.

(8) *Feuchte Wohnungen*, etc. Deutsche Vierteljahresschrift f. off. Gesundheitspflege, I. Heft, 1903.

(9) *Ricerche relative all'umidità delle case di Milano*. Giornale R. Soc. ital. d'igiene, Milano, vol. XXIII, 1901.

Quindi opportuno mi sembra che cotesti limiti siano stabiliti con un metodo dettagliato con precisione, che offra il maggior numero possibile di garanzie, che sia accettato da tutti e che siano stabiliti di luogo in luogo e consacrati nei regolamenti locali.

Dinanzi a queste incertezze e difficoltà ho creduto non completamente inutile aggiungere i miei sforzi a quelli di altri sperimentatori collo scopo unico di portare un contributo alla soluzione di un problema che interessa così da vicino la nostra salute.



L'acqua totale contenuta nei muri e nei materiali da costruzione si può supporre, con serio fondamento di verità, che esista in due stati diversi: cioè come *acqua igroscopica* e di *imbibizione* e come *acqua* di *combinazione*.

In queste condizioni, si capisce facilmente che l'acqua igroscopica di un muro, per ogni variazione della umidità dell'aria, cresce o diminuisce, e quindi l'acqua che dalle mura umide può passare nell'ambiente e inumidire soverchiamente ed anche saturare l'aria è precisamente quella igroscopica e di imbibizione.

L'acqua di combinazione invece rimarrà costantemente nel materiale fino a che una temperatura elevatissima, che non si raggiunge mai in nessun clima, non arrivi a sottrarla ed a disfare la combinazione.

Perciò l'essiccamento del materiale, come si fa ora e collo scopo di cui abbiamo già parlato, alla temperatura tra 100°-110° C, toglie non solo l'acqua igroscopica, ma anche l'acqua di combinazione, ed i risultati sono affetti da un errore variabile prodotto dalla quantità di acqua di combinazione che si trova nel materiale del muro, acqua che non può venire in conto allorchè si tratti di conoscere se un ambiente qualsiasi offra la salubrità voluta.

Su questo concetto, fino ad ora, poco si è fermata l'attenzione degli igienisti e dei vari sperimentatori, tanto che il metodo di Ballner (1), che presentava per la bisogna le migliori garanzie, è stato completamente trascurato od accettato con diffidenza. Niente, difatti, meglio dell'anidride fosforica può assorbire a temperatura ordinaria dai materiali diversi l'acqua igroscopica e di imbibizione e lasciare intatta l'acqua di combinazione. L'abbandono perciò del metodo di Ballner

(1) *Experimentelle Beiträge zur Methodik der Mauerfeuchtigkeitsbestimmung.* Archiv f. Hygiene, Bd. 37, p. 310, 1900.

non si può dire giustificato se non si pensi alla lungaggine ad esso inerente.

In queste condizioni, era necessario di cercare un mezzo che desse rapidamente i risultati del metodo di Ballner ed ovviasse ai difetti del metodo di Glässgen. Cioè, era necessario di congegnare un metodo col quale si potesse determinare l'acqua igroscopica e d'imbibizione separatamente dall'acqua di combinazione. E questo metodo mi è stato facile trovarlo, usando l' apparecchio di riscaldamento di Glässgen modificato da Casagrandi, e facendo essiccare il materiale prima ad una temperatura bassa, poi ad una temperatura più elevata. Procedevo cioè nel seguente modo:

Polverizzavo il materiale in esperimento in un mortaio asciutto e la polvere la conservavo in una boccetta di vetro a tappo smerigliato. Di questa pesavo colla esattezza di un decimilligrammo due campioni (ognuno di 3 o 4 gr.) in due navicelle di porcellana e li facevo essiccare nel tubo di Glässgen, nella cui doppia parete mettevo dell'acqua, alla temperatura di 50° C. L'aria che attraversava l'apparecchio, moderatamente aspirata da una pompa ad acqua, gorgogliava in tre bottiglie di lavaggio in due delle quali era contenuta una soluzione concentratissima di soda caustica, nell'altra dell'acido solforico concentrato. I lavaggi servivano a privare l'aria dell'anidride carbonica e della umidità. Le pesate si facevano di tre in tre ore fino a *peso costante, fino a che cioè la differenza tra due pesate consecutive non oltrepassasse i cinque decimilligrammi.*

In questo modo, si poteva supporre con una certa sicurezza che si fosse eliminata una porzione sola dell'acqua esistente nel materiale e precisamente quella igroscopica o di imbibizione e che un'altra porzione sarebbe rimasta, quella di combinazione. Se ciò fosse stato vero inumidendo il materiale, seccato a 50°, con acqua, questa avrebbe dovuto eliminarsi completamente per nuova essiccazione a 50°, non potendo passare allo stato di combinazione. Aggiungevo perciò una quantità pesata di acqua e rimettevo le navicelle nelle condizioni di prima. Ho potuto così constatare che tutta l'acqua aggiunta si evaporava in un tempo più o meno breve, a seconda dei diversi materiali. E questa prova è stata fatta non una volta, ma due volte di seguito e con quantità anche maggiori di acqua e sempre cogli stessi risultati.

Finalmente riscaldavo a 100° e notavo la quantità d'acqua che si evaporava a questa temperatura.

Operando in questo modo con tutti i materiali che ordinariamente servono nella costruzione delle abitazioni, ho avuto i risultati che espongo nel seguente quadro:

Materiale adoperato	Acqua naturalmente contenuta e perduta a 50°C %	Acqua aggiunta al materiale secco a 50° %	Acqua perduta a 50° C %	Differenza %	Acqua perduta a 100° C %
Malta	16.53	18.87	18.87	0.00	1.32
		35.93	35.93	0.00	
	16.55	18.45	18.43	— 0.02	1.33
		42.78	42.76	— 0.02	
Tufo	0.65	27.60	27.58	— 0.02	1.76
		35.46	35.46	0.00	
	0.62	24.05	24.04	— 0.01	1.78
		28.20	28.20	0.00	
Mattone	0.12	22.47	22.47	0.00	0.07
		21.58	21.58	0.00	
	0.12	21.22	21.22	0.00	0.06
		21.60	21.60	0.00	
Travertino	0.35	36.37	36.37	0.00	0.03
		12.64	12.64	0.00	
	0.36	26.62	26.62	0.00	0.03
		14.15	14.15	0.00	
Marmo	0.12	33.23	33.23	0.00	0.010
		8.68	8.68	0.00	
	0.10	18.69	18.69	0.00	0.016
		10.89	10.89	0.00	

Da essi apparisce chiaramente che l'acqua che si evapora a 50° e nelle condizioni dette dianzi è l'acqua igroscopica od anche di imbibizione che non ha contratto alcuna combinazione col materiale oppure che le combinazioni contratte sono così labili da disfarsi ad una temperatura molto bassa. Risulta altresì che a 50° non si perde tutta l'acqua contenuta nel materiale e che quella rimasta è diversa per i diversi materiali, ed in certo modo corrispondente alle previsioni probabili che potevano farsi. Così il tufo contiene la massima quantità di acqua di combinazione; poi viene la malta, il mattone, il travertino ed il marmo. E questo fatto non mi sembra trascurabile quando specialmente si voglia giudicare della conducibilità termica maggiore o minore dei vari materiali o delle mura costruite con materiali diversi.

Come confronto ed anche per confermare che l'acqua che si perde a 50° non è acqua combinata, le stesse esperienze descritte or ora, sono state fatte seguendo il metodo di Ballner con il quale si aveva la sicurezza di determinare la sola acqua igroscopica, perchè l'anidride fosforica non è in grado di staccare l'acqua che nei materiali si dice combinata. Contemporaneamente quindi al metodo di Glässgen, esponevo il medesimo materiale in un essiccatore con anidride fosforica. Arrivato a peso costante aggiungevo un determinato peso d'acqua e l'esponevo nuovamente all'azione essiccante dell'anidride fosforica.

I risultati ottenuti sono esposti nella seguente tabella:

Materiale adoperato	Acqua naturalmente contenuta e perduta a 50° %	Acqua naturalmente contenuta e perduta per essiccamento con anidride fosforica %	Acqua aggiunta al materiale seccato mediante anidride fosforica %	Perdita di acqua aggiunta al materiale già seccato con anidride fosforica %
Malta	16.53 16.55	15.84	19.82	19.82
Tufo	0.65 0.62	0.63	25.44	25.44
Mattone	0.12 0.12	0.12	22.63	22.63
Travertino	0.35 0.36	0 0	— —	— —
Marmo	0 12 0.10	0 0	— —	— —

Essi dimostrano in modo non dubbio che tanto a 50°, quanto con anidride fosforica si hanno le stesse perdite e che quindi la modificazione da me proposta al procedimento di Glässgen permette di determinare con grande esattezza e sollecitudine l'acqua igroscopica od anche di imbibizione contenuta nei materiali dei muri. Se così è per quale ragione si deve abbandonare il processo di Ballner per il nuovo da me proposto? La cosa è facile a capirsi: per economia di tempo. Infatti per essiccare la malta col metodo di Ballner occorrono 9 giorni, per essiccare il tufo 7, per il mattone 4, mentre per lo stesso effetto a 50° sono necessarie al più 9 ore.

Infine, per confermare ancora che l'acqua perduta a 100° è acqua di combinazione e non igroscopica, a tre campioni di muro nei quali avevo determinato l'acqua igroscopica e l'acqua di combinazione ho aggiunto una quantità abbondante di acqua e nuovamente li ho sottoposti alla essiccazione a 50° e 100°. In questo modo il materiale ha riac-

quistato l'acqua di combinazione, che corrisponde precisamente alla quantità trovata nella determinazione antecedente. La seguente tabellina dà la dimostrazione evidente di ciò che è stato detto:

Materiale adoperato	Perdita a 50° %	Perdita a 100° %	Acqua aggiunta %	Acqua perduta a 50° %	Differenza %	Perdita a 100° %
Muro interno umidissimo . .	15.86	0.83	28.28	27.50	0.78	0.77
Muro interno umido	5.90	0.52	29.75	29.30	0.45	0.44
Id.	3.51	0.65	31.20	30.60	0.60	0.60

In seguito ai risultati delle esperienze riferite, ho voluto fare alcune determinazioni su materiali di muri presi in condizioni diverse, anche per avere un criterio riguardo al limite massimo da adottarsi. Perciò ho esaminato campioni di muri esterni e di muri interni. Questi campioni poi si facevano essiccare fino a peso costante, prima alla temperatura di 50°, poi di 100° C, ed ho avuto i risultati che raccolgo nella tabella seguente:

Numero d'ordine	Materiale adoperato	Perdita a 50° C %	Perdita a 100° C %
1	Muro interno di recente costruzione . . .	11.02	0.76
2	Muro esterno, dopo più giorni di pioggia .	18.14	0.65
3	Muro interno asciutto	3.06	0.72
4	Id. umido	12.85	0.73
5	Id. asciuttissimo	1.82	0.85
6	Id. id.	2.45	0.88
7	Id. id.	2.49	0.94
8	Id. umido	15.86	0.83
9	Id. id.	5.90	0.52
10	Id. id.	3.51	0.65

Da essa apparisce chiaramente che, operando nel modo prescritto innanzi, cioè essiccando il materiale a 100°-110° si commette un errore che raggiunge circa l' 1 % coi materiali ordinari e che può arrivare col tufo a circa l'1, 5 %, e che proviene dall'acqua di combinazione.

Questa non deve essere tenuta affatto in conto, perchè, come abbiamo già detto, potrà contribuire a rendere più o meno conducibile un muro pel calore, ma non a rendere umida l'aria di un ambiente. Quindi i limiti stabiliti sulle esperienze eseguite colle prescrizioni vecchie devono essere riveduti accuratamente anche con lo scopo di eliminare le non poche divergenze che si hanno tra sperimentatore e sperimentatore, e che non hanno mai condotto ad un accordo definitivo. E' mia convinzione che cause di tale disaccordo siano state precisamente l'acqua di combinazione dei vari materiali da costruzione e l'essiccazione mai fatta fino a costanza di peso.

Conclusioni.

Dalle esperienze riferite si può concludere:

1° che l'umidità dei muri, determinata col metodo di Glässgen, tra 100° e 110°, comprende l'acqua igroscopica o di imbibizione e l'acqua di combinazione; quindi tale umidità non esprime in modo completo la tendenza di un muro a rendere umida l'aria che lo lambisce, perchè questa è determinata unicamente dall'acqua igroscopica o di imbibizione;

2° che essiccando il materiale di un muro, invece che a 100° o 110°, a 50° *fino a perdita di peso* si determina la sola acqua igroscopica, quella cioè che presenta il massimo interesse sanitario;

3° che nei vari materiali, costituenti un muro, l'acqua di combinazione può variare entro limiti abbastanza grandi, tra 1,78 nel tufo e 0,03 nel travertino, con un valore intermedio, pure elevato, di 1,33 nella malta;

4° che i limiti massimi di umidità nei vari regolamenti locali sono affetti dall'errore prodotto dall'acqua di combinazione, che essendo variabile grandemente, li rende incerti nel riguardo sanitario. Ed è desiderabile che questi limiti siano nuovamente stabiliti non sulla base dell'acqua totale, ma dell'acqua igroscopica o di imbibizione.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PISA

Circa la disinfezione a vapore dei crini

Ricerche del dott. GINO DE' ROSSI, aiuto.

La industria della lavorazione dei crini, basata in massima parte sulla importazione di questi materiali da lontani paesi (America del Sud, Russia asiatica) mancanti di ogni organizzazione sanitaria e di ogni sorveglianza igienica sul commercio di esportazione, è stata ripetutamente segnalata [Surmont e Arnould (1), Kroell (2), Silberschmidt (3), Mosebach (4), Max Gruber (5), ecc.] come causa della comparsa di accidenti di pustola maligna e anche di diffusioni epidemiche di carbonchio epizootico. In conseguenza di che, in Germania fino dal 1899 vige una disposizione legislativa la quale prescrive che i crini importati debbano sempre essere sottoposti alla disinfezione con vapore saturo alla sovrappressione di 0.15 atmosfere, per la durata di ½ ora. E in seguito a reclami degli industriali i quali lamentavano che in tali condizioni i crini venivano deteriorati, si sono eseguite ricerche apposite [Musehold (6-7)] le quali dimostrano non potersi ridurre la durata di sterilizzazione se si voglia esser sicuri dell'uccisione delle spore carbonchiose, e d'altra

(1) Revue d'hygiene, 1893, p. 114.
(2) Aerztl. Mittheilungen aus und für Baden, 1893. Rif. in Hygienische Rundschau, 1894, p. 142.
(3) Zeitsch. f. Hygiene und Infektionskr. B. 21.
(4) Inaug. Diss. Bonn, 1901. Rif. in Hygienische Rundschau, 1903, p. 883.
(5) Das oesterreichische Sanitaetswesern, 1901. Rif. in Revue d'hygiène, 1902, p. 472.
(6) Arbeiten aus den Kais. Gesundsheitsamte, B. 15, p. 426.
(7) Id. B. 18, p. 1.

parte negano l'asserito deterioramento, non verificandosi modificazioni dell'aspetto microscopico e del peso dei crini.

Qualche altro tentativo di disinfezione chimica, [Gruber (1), Dunbar e Musehold (2)], non sembra aver dato risultati molto incoraggianti, come era da aspettarsi, avendosi a che fare con materiali facilmente deteriorabili e che quindi non possono trattarsi con agenti chimici molto energici e, d'altra parte, dovendosi mirare soprattutto alla uccisione delle resistentissime spore carbonchiose.

Ma anche limitando il campo di ricerca alla sterilizzazione col vapore, conviene riconoscere che lo studio della questione meritava di essere un po' allargato sia nel senso di determinare con metodo rigorosamente scientifico le modificazioni che i crini subiscono in seguito all'esposizione al vapore acqueo, sia per ricercare in tal modo quale sia fra i vari sistemi di applicazione di questo mezzo disinfettante quello che appaia meno dannoso per l'integrità del materiale e che quindi permetta di meglio conciliare la tutela della salute degli operai con gli interessi economici dell'industria.

Ho creduto opportuno eseguire tali ricerche, tanto più che anche in Italia, sebbene l'industria della lavorazione dei crini non abbia per ora un grande sviluppo, la disinfezione dei materiali importati dovrà prima o poi essere oggetto di speciali disposizioni regolamentari da parte dell'autorità sanitaria (3).

***

Tenendo conto degli usi cui i crini sono destinati (imbottitura di materassi, cuscini, selle, ecc.; fabbricazione di funi, spazzole, bottoni; confezione di stoffe, ecc.) le proprietà di essi più interessanti e che meritava di controllare sono la *resistenza alla trazione* e la *elasticità*, che ho studiato per mezzo di due apparecchi da me appositamente fatti costruire.

Il primo (fig. 1) serve a determinare la resistenza alla trazione. Si ha un secchiello di legno *S* assai leggero (40-50 gr.) con un manico di fil di ferro, e un indice laterale, pure di filo di ferro, piegato a squadra, e che quando il secchiello sta sospeso (com'è rappresentato nella figura) pe-

---

(1) Loco citato.

(2) Arbeiten aus den Kais. Gesundsheitsamte, B. 15, p. 114.

(3) Questo lavoro fu intrapreso per rispondere alla lusinghiera richiesta del Direttore generale della Sanità che questo Istituto d'igiene, all'uopo sussidiato, contribuisse agli studi sulla migliore utilizzazione dei resti animali in rapporto con la profilassi delle malattie carbonchiose.

netra colla sua estremità nella fessura longitudinale praticata nella tavoletta T (raccomandata al sostegno *C*) che porta una scala centimetrata. Il secchiello viene appunto sospeso per mezzo del crine da studiarsi infilato nel manico e i cui due capi sono solidamente fissati nella morsa *M*:

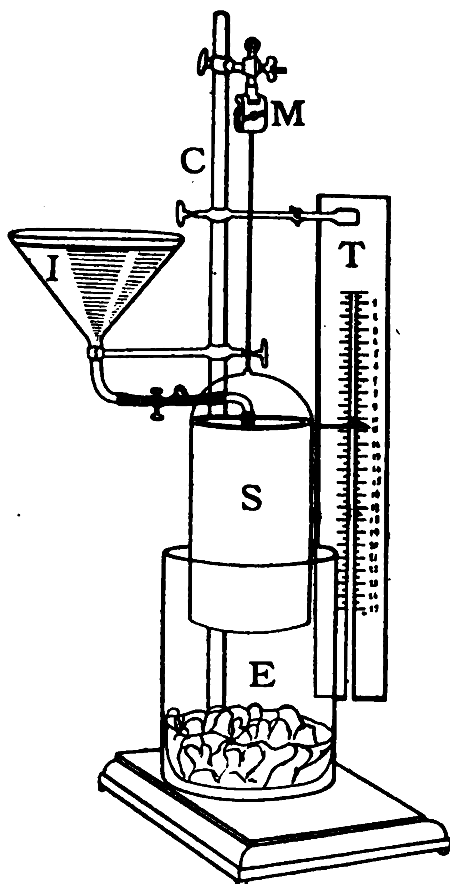


Fig. 1.

il crine è tagliato della lunghezza di 45 cm. e i due capi essendo impegnati nella morsa per 2 ½ cm., la lunghezza del doppio filamento libero è di 20 cm. Per evitare il deterioramento che la morsa metallica talvolta porta al crine, si possono riunire i due capi di esso tra due scheggie di legno duro che poi si serrano tra le due branche della morsa.

Il sostegno *C* sorregge poi un imbuto *I*, corto e molto svasato, pieno di mercurio: la sua parte inferiore, piegata ad angolo retto è congiunta per mezzo di un pezzetto di tubo di gomma (che porta una pinza a pressione) con un altro tubo di vetro pure ripiegato ad angolo in basso e che termina con una sfilatura il cui orifizio è calibrato in modo che lasci

cadere dall'imbuto 100 gr. di mercurio ogni 10 minuti secondi (1). Questa sfilatura, che si fa capitare presso l'orifizio superiore del secchiello, non si vede nella figura perchè, ad evitare lo spandimento del mercurio che cadrebbe con troppa violenza, viene introdotta in un tubo di gomma che raggiunge quasi il fondo del secchiello stesso. E sempre per evitare possibili perdite di mercurio il secchiello si trova nell'interno di un recipiente di vetro *E* con dell'ovatta nel fondo.

Essendo così pronto l'apparecchio si tien nota della posizione dell'indice laterale del secchiello lungo la scala graduata (ove si apprezza molto esattamente il quarto di centimetro); quindi si lascia cadere il mercurio aprendo la pinza a pressione e si fa scattare contemporaneamente lo scappamento di un contasecondi. Si registra, dettando le cifre ad un assistente, la posizione dell'indice di 10 in 10 secondi, fino al momento della rottura del crine, e allora si arresta immediatamente il cronometro e la caduta del mercurio.

Noi conosciamo così non solo il peso necessario per rompere il crine ma anche l'allungamento successivamente verificatosi per i vari pesi fino a quello di rottura (2). E rappresentando con una curva le successive posizioni dell'indice lungo la scala vedremo che le modificazioni dell'andamento di questa curva e della sua posizione finale nei crini diversamente trattati, ci indicheranno molto chiaramente e concordemente le modificazioni della resistenza alla trazione. Naturalmente nessun valore avrebbero le ricerche fatte con uno o con pochi crini, perchè sebbene il materiale si sottoponga ad una scelta accurata eliminando i crini eccezionalmente sottili o grossi, ciò nondimeno esistono fra i diversi crini (anche di un medesimo animale) differenze assai notevoli: ma riunendo un numero assai grande di esperienze tali differenze scompaiono e si hanno risultati molto concordanti e dimostrativi.

Data una partita di crini da mettersi in esperimento, io cominciavo collo sceglierne un numero sufficiente di aspetto e lunghezza presso a poco uguali, di cui mettevo a pari l'estremità più grossa tagliandoli poi verso l'altro estremo del fascio, della lunghezza di 45 cm. Li distribuivo in tante porzioni, a seconda degli esperimenti da eseguirsi, ciascuna di 40-50 crini, i quali poi (o rimasti come controllo, o sottoposti ai vari trattamenti che diremo a suo luogo) si saggiavano, nel modo descritto, per la resistenza, raccogliendo in apposite tabelle (di cui si ha un

---

(1) Data la ampia sezione dell'imbuto e per conseguenza la poca differenza di livello tra il principio e la fine dell'operazione, la diminuzione di pressione dovuta al progressivo svuotamento dell'imbuto non ha che una scarsissima influenza sulla quantità di mercurio che cade nell'unità di tempo.

(2) In realtà noi non conosciamo che l'allungamento verificatosi di 10 in 10 secondi, ma per quanto si è detto circa la regolarità della caduta del mercurio, possiamo ritenere che in ognuno di questi intervalli di tempo l'aumento di peso sia con grande approssimazione di 100 grammi. Tanto è vero che nelle tabelle numeriche (cfr. tab. I) le cifre indicanti i pesi di rottura dei crini sempre corrispondono (o se ne differenziano al massimo di 50 grammi) al decuplo del numero di secondi che è durata l'operazione.

esempio nella tab. I) le cifre indicanti l'allungamento subìto dai crini di 10'' in 10'', ed i pesi di rottura. Di questi ultimi era possibile calcolare la media che però avrebbe avuto assai scarsa importanza per le forti oscillazioni dei singoli valori: ma affatto impossibile era lo stabilire una media delle cifre ottenute nei tempi successivi dei vari esperimenti data la disuguaglianza delle serie relative. Riescono invece molto dimostrative sia per l'uno che per l'altro dei due fatti le rappresentazioni grafiche (fig. 3), nelle quali la linea orizzontale, delle ascisse, porta la indicazione dei tempi di osservazione, di 10'' in 10'', quella delle ordinate l'allungamento verificatosi in centimetri e quarti di centimetro. Ad ogni crine saggiato corrisponde una linea: di queste alcune si sovrappongono in alcuni tratti del loro decorso, ma sono tutte contrassegnate da un dischetto nero nel punto di rottura. Si ha così per ogni gruppo di crini un fascio di linee, di cui la grandissima maggioranza presentano un andamento del tutto uniforme (1); e il confronto delle curve generali rappresentate da ciascun fascio, e della posizione dell'insieme dei dischetti terminali, ci permetterà di renderci conto a colpo d'occhio e in modo grandemente dimostrativo delle modificazioni che in seguito ai varii trattamenti dei crini si producono nella resistenza alla trazione.

***

Per lo studio della elasticità, ho cercato di mettermi in condizioni il più possibile simili a quelle in cui i crini, nelle loro applicazioni industriali, devono spiegare tale proprietà. Quindi, per imitare il meglio possibile il modo di essere dei crini arricciolati, da imbottitura, io ravvolgevo intorno a un cilindro di cartoncino del diametro di 3 cm. un certo numero di crini (8-10-12 a seconda della loro lunghezza) che venivano fissati insieme per mezzo di altri crini infilati in un ago e passati, ripassati e incrociati più volte in modo da aversi un anello costituito da una specie di cordicella ben salda, dello spessore di 2-2 ½ mm. (vedi fig. 2-*A*). L'apparecchio per misurare la elasticità di questi anelli, consta (fig. 2) di un piano di legno *N* su cui si elevano tre colonnette triangolari di ottone dell'altezza di 5 cm. circa, poste due posteriormente, la terza nel mezzo un po' più in avanti, in modo da delimitare un intervallo di 2-2 ½ mm. ove si pone l'anello di crine. Questo si trova così in posizione obbligata, perfettamente verticale, e quando venga compresso, non può, per l'ostacolo delle tre colonnette, piegarsi in dietro o in avanti ma solo può schiacciarsi espandendosi lateralmente. Lungo le tre colonnette si muove una lastrina rettangolare *R* di vetro e le piccole guarniture che portano due dei suoi tre fori la mantengono in posizione perfettamente orizzontale. Nel centro

---

(1) Ciò ha permesso di eliminare, da ogni fascio, non più di 2-3 linee (togliendo di mezzo anche le serie corrispondenti delle tabelle) di andamento eccezionalmente irregolare, in rapporto manifestamente o con speciale deterioriamento o con proprietà eccezionali di singoli crini, o con intromissione di crini di altra qualità, ecc.

della lastrina viene a capitare la punta di una vite micrometrica la cui testa *T*, divisa in 50 parti uguali, si muove rasente un' asticella metallica *O* che porta una scala divisa in millimetri. E poichè il passo della vite è tale che per ogni giro completo si ha l' abbassamento di 1 mm., così si possono apprezzare gli spostamenti della punta inferiore della vite con l'esattezza del cinquantesimo di millimetro.

Con questo apparecchio si può saggiare in due diversi modi la elasticità dei crini foggiati ad anello, e cioè se ne può ricercare la *compressibilità* o *flessibilità*. e la *elasticità* propriamente detta.

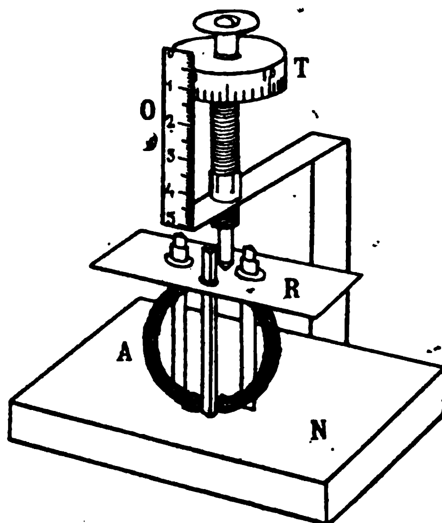


Fig. 2.

Per eseguire la ricerca della *compressibilità* giova avvertire anzitutto che la lastrina *R* di vetro essendo troppo leggera (10-12 gr.) conviene deporvi in due punti simmetrici due pesi di 20 gr. ciascuno, a meno che non si preferisca usare addirittura una lastrina metallica del peso di 50 gr. L'andamento della ricerca è il seguente: tenendo sollevata la lastrina, si mette a posto l' anello di crini, osservando che esso mantenga la sua forma perfettamente rotonda; quindi si abbassa con cautela la lastrina fino che venga a sfiorare l'anello e si cala la vite micrometrica facendo che la punta di essa tocchi la superficie superiore della lastrina stessa. Allora questa viene abbandonata al suo peso, e naturalmente discende lungo le colonnine comprimendo l'anello. Presa nota dell' indicazione della posizione iniziale della vite micrometrica, questa si abbassa fino a toccare nuovamente la lastrina, e così si conosce con l'esattezza del cinquantesimo di mm. la depressione subìta dall'anello. Si rialza la vite e con essa la lastrina fino alla posizione iniziale, si fa girare l'anello di un quarto di circolo cercando di ridargli il più possibile la sua forma circolare in modo che esso tocchi appunto la superficie inferiore della lastrina; si torna a far cadere questa,

e si ripete l' operazione, variando sempre la posizione dell' anello, per 10-15 volte. Si può avere così una media molto attendibile della depressione che l'anello di crine subisce per il peso della lastrina: ripetendo la ricerca dopo la disinfezione si ottiene un altro valore medio che può riportarsi a quello precente calcolato come 100, avendosi così un dato utilmente comparabile con quelli forniti da altri anelli trattati differentemente.

Per il saggio della *elasticità* propriamente detta, l'anello di crine vien posto nella solita posizione, fra le tre colonnette: la lastrina di vetro di dimensioni ridotte al minimo e quindi leggerissima (4-5 gm.) posa su di esso senza deformarlo affatto, e portando a contatto con la lastrina stessa la punta della vite si tien conto, per mezzo della scala, della sua posizione. Allora girando la vite si obbliga la lastrina ad abbassarsi, deprimendo l'anello, per uno spazio determinato, per esempio, un centimetro; quindi si gira la vite in senso inverso, di tanto alzandola di quanto la elasticità dell'anello di crine riesce a spingere in alto la lastrina, e si nota di quanto questa si è risollevata. Si ripete il saggio 10-15 volte, spostando ogni volta l'anello di un quarto di cerchio e si calcola la media dei valori ottenuti. E se, come nel caso precedente, si torna ad eseguire la ricerca dopo la disinfezione, il valore medio del risollevamento della lastrina per effetto della elasticità dei crini disinfettati, rapportato al valore medio ottenuto prima della disinfezione calcolato come 100, ci dà modo di stabilire con vari saggi comparativi l'effetto dei diversi trattamenti.

***

Un'importante particolarità di tecnica sperimentale da prendere in considerazione, data la grande igroscopicità dei crini e le modificazioni che conseguentemente si verificano nella loro resistenza ed elasticità, consisteva nello stabilire se queste proprietà dovevano saggiarsi su crini previamente essiccati o lasciati nell'ambiente colla loro umidità normale. A tale scopo ho eseguito colla tecnica descritta vari esperimenti con crini non disinfettati o disinfettati in vario modo, ma dividendo ogni saggio in due parti di cui una prima della ricerca veniva tenuta per 24 ore in essiccatore ad $H_2 SO_4$, l'altra veniva lasciata all'ambiente. Non riporto, per brevità, i dati relativi a queste esperienze, bastando di stabilire che i risultati ottenuti negli esperimenti di trazione appaiono assai più costanti e dimostrativi quando si agisce sui crini lasciati colla loro normale umidità. Invero, in seguito all'essiccamento (fosse o no preceduta la sterilizzazione) i crini in massima parte si rompevano con scarsissimo allungamento, e con notevole irregolarità, che non permetteva di stabilire differenze evidenti tra le varie serie di crini non sterilizzati o sterilizzati in vario modo, all'opposto di ciò che si verifica nei crini che o senza sterilizzare o dopo sterilizzati si lasciano liberamente esposti all'aria per 24 ore, i quali presentano quella regolarità di comportamento generale già segnalata, che appare evidente nelle grafiche più oltre riportate (fig. 3), e che permette di cogliere con grande facilità le differenze esistenti fra i vari saggi.

Quanto alla ricerca della compressibilità e dell'elasticità, pur variando

i valori assoluti a seconda che si adoperavano anelli tenuti per 24 ore nell'essiccatore o lasciati all'aria, le cifre relative indicanti le modificazioni subite per la disinfezione non erano in generale discordanti; cosicchè per uniformità di tecnica ho preferito anche qui di adoperare materiali rimasti esposti nell'ambiente.

Per evitare che le variazioni dello stato igrometrico dell'aria facessero risentire la loro azione disturbatrice, io procuravo, assoggettandomi anche a molte ore di lavoro continuato, di eseguire tutti i saggi di un esperimento nel più breve tempo possibile, avendo cura, quando un esperimento doveva necessariamente prolungarsi per più giorni successivi, di eseguire ogni giorno un nuovo saggio con i crini di controllo non disinfettati, per mettermi in guardia contro possibili errori che, date le piccole differenze nel contenuto di umidità dell'aria del laboratorio da un giorno all'altro, non ho mai avuto occasione di constatare.

***

Con queste norme, ho eseguito diverse serie di ricerche utilizzando cinque sorta di crini, e cioè quattro code di cavalli (uno morto per polmonite, tre morti o abbattuti per vari accidenti, ma giovani e in ottime condizioni di nutrizione) e una partita di crini di Russia favoritami dalla ditta Pacchetti di Milano.

Riportare i dettagli di tutti gli esperimenti darebbe luogo a un inutile sfoggio di cifre e di tabelle, data l'assoluta concordanza dei risultati. Mi limito a riferire per esteso su uno di essi (eseguito con i crini della coda di una giovane cavalla di razza maremmana morta in seguito al parto), *coll'intesa che le conclusioni che se ne deducono son suffragate da identici risultati ottenuti con gli altri quattro materiali.*

Eliminati dalla coda i crini più corti (inferiori a 60 cm.), quelli abnormemente grossi o sottili, e messine da parte un certo numero per gli esperimenti della elasticità, gli altri, tagliati della lunghezza di 45 cm., furono suddivisi in 7 porzioni di cui 3 furono lasciate da parte come controlli, e le altre furono sottoposte ai seguenti trattamenti:

a) esposizione per 1 ora a 100° nella pentola di Koch a vapore fluente;

b) esposizione per 10′ a 100° (1) nella pentola di Koch, ripetuta per 3 volte a distanza di 24 ore;

---

(1) Questi tempi possono considerarsi come relativamente esatti; infatti essendo la stufa a 100° ne veniva alzato il tappo, e con la massima rapidità si gettavano i crini nel secchiello già in essa contenuto e si richiudeva; dopo appena 1½ minuto il termometro tornava già a segnare la temperatura di 100°.

c) esposizione in autoclave Chamberland, per 40′ di cui 20′ per raggiungere la temperatura di 110°, e 20′ a 110°;

d) esposizione in autoclave Chamberland, per 35′, di cui 25′ per raggiungere la temperatura di 120°, e 10′ a 120°.

I crini, dopo disinfettati, rimasero per 24 ore esposti all'aria (insieme con quelli non disinfettati); poi in tre giorni successivi (di ottimo tempo e con identico stato igrometrico dell'aria) furono assoggettati agli esperimenti di trazione. Delle 5 tabelle numeriche relative a questi esperimenti, per economia di spazio, non riporto, come esempio, che quella (Tab. I *a*,) relativa ai crini normali, non disinfettati: delle altre, in tutto analoghe a questa, riferisco solo i pesi di rottura dei crini (Tab. I, *b*] *c*] *d*] *e*]). Però tutti i dati delle 5 tabelle sono tradotti nelle grafiche della figura 3, ove la grafica segnata colla cifra 0 corrisponde ai crini non disinfettati (dati della Tabella I *a*]); quella segnata 1 ai crini tenuti per 1 ora al vapore fluente a 100° (Tab. I *b*]); la 2 ai crini tenuti per 10′ al vapore a 100° per 3 giorni consecutivi (*c*];; la 3 ai crini tenuti per 20′ a 110° (*d*]); la 4 per 10′ a 120° (*e*]). L'esame di queste grafiche mostra che nei crini sottoposti a una trazione regolarmente crescente, l'allungamento ha luogo secondo una legge costante. Si ha un primo periodo (fino a 30″, ossia 300 gr. nella grafica 0) in cui non sembrano affatto risentire della trazione, non presentando alcun apprezzabile allungamento [linea unica comprendente tutte le linee del fascio]; segue poi un breve periodo (da 400 a 700 gr. di trazione nella grafica 0) nel quale comincia a verificarsi un lieve allungamento [linee molto vicine alla orizzontale]; si ha quindi (fino a 1100 gr.) un brusco e molto rapido allungamento [linee più vicine alla verticale] che poi si rallenta alquanto [ripiegamento in basso delle linee] fino al momento di rottura dei crini indicato dai dischetti terminali. Si ricordi che questi dischetti rappresentanti i tempi di rottura indicano anche con notevolissima approssimazione i pesi di rottura in grammi corrispondenti al decuplo delle cifre indicanti i tempi (linca delle ascisse). Si noti poi che la posizione reale di questi dischi è solo sulle linee verticali, quelli dovuti necessariamente segnare fuori di esse perchè appartenenti a due o più serie con identico andamento terminale si devono considerare come appartenenti alla linea immediatamente a sinistra.

Ciò posto, risulta evidente che se dai crini non disinfettati si passa a quelli disinfettati a 100° per un'ora e successivamente a quelli disinfettati per 10′ a 100° per tre volte, per 20′ a 110°, per 10′ a 120°, si nota un deterioramento che, assai poco marcato nel primo caso va negli altri casi facendosi sempre più notevole, fino a raggiungere un

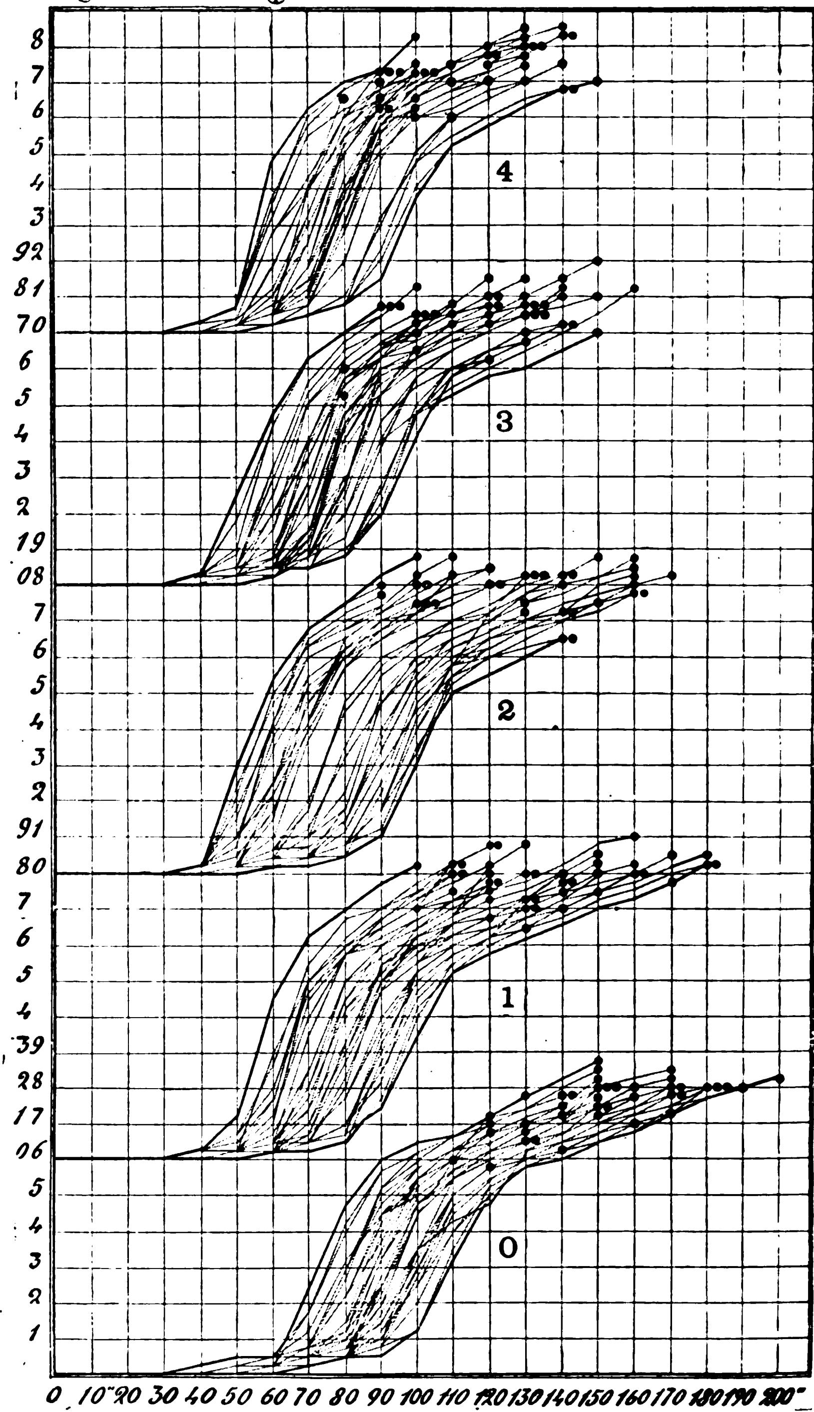


Fig. 3. (V. spiegazione a pagg. 555 e 559).

massimo nei crini sterilizzati a 120°; ciò che risulta così dalla posizione dell'insieme dei dischi terminali che, evidentemente, va spostandosi sempre più verso sinistra (= diminuzione del peso necessario per la rottura) sia dall'andamento delle curve che, nel loro complesso, tendono sempre più ad avvicinarsi alla verticale (= allungamento sempre maggiore per un medesimo peso.

***

Lo studio delle modificazioni della compressibilità e dell'elasticità fatto, colla tecnica già descritta, sugli anelli composti dei medesimi crini e assoggettati agli stessi trattamenti disinfettanti, dà presso a poco lo stesso risultato. Così, quanto alla *compressibilità* la tabella II dimostra che, considerando come 100° la depressione subìta per il peso della lastrina dagli anelli di crine non disinfettati,

la depressione dell'anello rimasto a 100° per 1 ora è 121;
» » » 3 volte a 100° per 10′ è 130;
» » » a 110° per 20′ è 130;
» » » a 120° per 10′ è 156.

Anche qui dunque la minore deteriorazione si ha per la dimora a 100°, la massima per quella a 120°.

Risultati analoghi si hanno dallo studio della elasticità propriamente detta. I dati della tabella III (riferentisi al medesimo materiale) mostrano difatti che calcolando come 100° il sollevamento dovuto alla elasticità degli anelli di crine non disinfettati,

il sollevamento dell'anello rimasto a 100° per 1 ora è 101.6 (!);
» » » 3 volte a 100° per 10′ è 103.3 (!);
» » » a 110° per 20′ è 93.1;
» » » a 120° per 10′ è 96.1.

Appare evidente da ciò (e gli altri esperimenti non riportati confermano questa conclusione) che la elasticità dei crini poco o punto soffre per la disinfezione col calore umido; ma che se mai essa verrebbe leggermente diminuita per il trattamento a temperature superiori a 100°.

***

Sono note le belle osservazioni del Rubner (1) circa la favorevole influenza che il previo disseccamento dei corpi esposti al vapore

---

(1) Hygienische Rundschau, Bd. VIII, p. 721, 776; Bd. IX, p. 321.

acqueo nelle stufe di disinfezione ha sulla penetrazione del calore nell'interno dei corpi stessi. E data la grande importanza pratica di tale fatto, ove fosse applicata al caso dei crini, trattandosi di un materiale eminentemente igroscopico, ho voluto eseguire alcune ricerche, per stabilire anzitutto se l'essiccamento preventivo dei crini eseguito a freddo in essiccatore, o mercè il calore, aveva nessuna influenza sulle modificazioni che essi subiscono in seguito alla disinfezione, riserbandomi in secondo luogo di vedere se nel caso dei crini si verifica, e con quale efficacia, il fatto osservato dal Rubner.

Pertanto ho eseguito anzitutto le solite determinazioni della resistenza, compressibilità ed elasticità su diversi campioni di crini sottoposti ai vari modi di disinfezione, coll'avvertenza che ogni campione era stato previamente diviso in due parti, delle quali una prima della disinfezione era tenuta per 24^h in essiccatore, l'altra per ugual periodo di tempo in ambiente umido o esposto all'umidità naturale dell'aria. Orbene, senza stare a riferire, per le solite ovvie ragioni, le numerose tabelle relative a queste esperienze, dirò che esse e più specialmente le grafiche da esse desunte, dimostrano che l'azione deteriorante spiegata dal processo della disinfezione è presso a poco identica così sui crini prosciugati in essiccatore, come in quelli più o meno umidi.

Lo stesso può dirsi, e ciò è anche più interessante, del prosciugamento mercè il calore. Basta osservare i dati riassuntivi della tabella IV per riconoscere come la previa dimora per 40' in stufa di Meyer ad aria calda alla temperatura di 108°-109° C non ha la menoma influenza sui caratteri fisici studiati dei crini, e non modifica per nulla l'effetto della successiva disinfezione col vapore, verificandosi anzi il fatto che il deterioramento è se mai leggermente minore n i crini previamente essiccati col calore.

***

Dimostrato così che l'essiccamento precedente la disinfezione non modifica l'influenza di questa sulle proprietà fisiche dei crini, restava a stabilire se e quanto favorisse la penetrazione del calore.

Una prima serie di esperimenti fu fatta confezionando dei piccoli fasci di crine il più possibile uguali, della lunghezza di 5 cm. e del diametro di 2 cm. circa, che venivano anzitutto sterilizzati tenendoli per mezz'ora nell'autoclave a 120°; quindi nell'interno di ciascuno di essi, per mezzo del sottile ago di una siringa di Pravaz si depositava una goccia di una sospensione in acqua sterile di spore carbonchiose. Di tali fascetti poi alcuni erano tenuti in essiccatore per 24 ore, altri in ambiente umido, a bassa

temperatura (4°-6°), dopo di che si esponevano contemporaneamente e per varia durata di tempo, all'azione del vapore a 100° in una piccola stufa di Koch, e finalmente per mezzo di pinze sterilizzate venivano direttamente portati in recipienti con brodo sterile, e tenuti nel termostato a 37°. I risultati ottenuti non furono molto dimostrativi perchè la penetrazione del calore era sempre così rapida e la uccisione delle spore avveniva dopo un così breve intervallo di tempo (3'-4') che era difficile apprezzare le piccole differenze eventualmente esistenti nel periodo minimo necessario per la disinfezione. Con tutto ciò sta il fatto che non di rado ho osservato lo sviluppo del bacillo del carbonchio dai fascetti di crini posti nella stufa senza previo essiccamento, mentre quelli esposti al vapore per ugual periodo di tempo, ma previamente seccati, rimanevano sterili; mai si è verificato il caso inverso.

Ma un risultato assai più dimostrativo ho avuto da un altro esperimento indirizzato a stabilire direttamente la penetrazione del calore attraverso un grosso e denso strato di crini. Attorno al bulbo di un buon termometro centigrado ho disposto, legandoli molto strettamente, una notevole quantità di crini tagliati di una medesima lunghezza, in modo che il bulbo venisse a trovarsi proprio nel centro di un grosso e molto compatto cilindro di crini lungo 10 cm. e del diametro di circa 6 cm. Il termometro si teneva poi per 24 ore o in un ampio essiccatore ad acido solforico o in ambiente saturo di umidità e si sperimentava quindi la sua sensibilità al calore nel modo seguente: In un matraccio di vetro del volume di due litri con collo molto largo, si versava mezzo litro di acqua di fonte che si portava all'ebullizione e si lasciava bollire per 2-3 minuti. Allora si introduceva rapidamente in esso il termometro raccomandato con uno spago a un sostegno, sempre nella medesima posizione, in modo che l'estremità inferiore del cilindro di crini venisse a trovarsi circa 5 cm. al di sopra della superficie del liquido in ebullizione; si metteva in moto un contasecondi, e di 10 in 10 secondi si notava la temperatura segnata dal termometro.

Nella tabella V sono riferiti i valori medi di due serie di ricerche alternativamente fatte previo essiccamento o inumidimento dei crini. Il fatto della maggiore rapidità di penetrazione del calore nel primo caso è evidentissimo, e la favorevole influenza che l'essiccamento dei crini può avere sulla rapidità e sulla sicurezza della disinfezione non sembra aver bisogno di ulteriore dimostrazione.

***

Dall' insieme delle ricerche riferite può dedursi, come conclusione pratica, che *la deteriorazione dei crini (calcolata in base alle modificazioni della resistenza alla trazione e della elasticità) è relativamente piccola in seguito all'azione del vapore acqueo saturo a 100°, prolungata anche per 1 ora: va invece aumentando per l'applicazione della sterilizzazione frazionata (esposizione al vapore a 100° per 10' ripetuta per 3 giorni*

consecutivi) e specialmente poi per le temperature di 110° e 120° ad onta della diminuzione del periodo di applicazione (rispettivamente 20′ e 10′) delle temperature stesse: cosicchè il processo preferibile per la disinfezione dei crini appare quello dell'esposizione al vapore fluente a 100°. Siccome poi il prosciugamento preventivo dei crini (anche mediante l'aria calda, a circa 110°) mentre non ha nessuna influenza sull'azione che il vapore spiega su di essi, rende d'altra parte assai più rapida la penetrazione del calore, sembra in questo caso massimamente consigliabile l'uso di apparecchi nei quali alla disinfezione propriamente detta si possa far precedere un processo di prosciugamento del materiale, ciò che presumibilmente dovrà rendere più breve la durata del periodo di sterilizzazione e quindi anche minore il già scarso deterioramento dei crini esposti al vapore acqueo a 100°.

Pisa, marzo 1905.

ne da
nto d

O D'O
20
0
0
0
0. 25
0. 50
0. 50
1. 00
3. 50
4. 25
4. 75
6. 25
6. 50
6. 75
7. 25
7. 75
..
..
..
1650

r bre

1300
1000
1050
950

TABELLA III.

Saggio della elasticità. — **Sollevamento, in millimetri, della lastrina di vetro per azione della elasticità degli anelli di crine, compressi per un centimetro, prima e dopo le varie sorta di disinfezione a vapore.**

A		B		C		D	
Saggio preliminare	Dopo esposizione per un'ora a 100°	Saggio preliminare	Dopo esposizione a 100° per 10', ripetuta 3 giorni consecutivi	Saggio preliminare	Dopo esposizione a 110° per 20'	Saggio preliminare	Dopo esposizione a 120° per 10'
5.6	4.8	5.4	4.8	6.0	6.0	5 8	6.0
4.4	5.2	4.8	4.6	6.2	6.0	4 8	5.0
4.8	4.6	4.6	4.8	5.6	5.4	5.0	4.6
5.2	5.4	5.6	6.2	5.0	4.8	5.6	4.6
4.6	5.6	4.8	5.0	5.2	4 8	5.2	5.2
5.2	5.4	4.4	4.8	5.2	4.8	4.6	4.4
5.4	4.6	4.6	5.2	4 8	5.0	5.4	5.4
4.8	4.8	4.8	4 8	5.4	5.2	5.0	4.8
4.8	5.4	5.0	5.2	6.0	4.8	5.4	5.2
5.2	5.0	5.0	5.2	6.0	4.8	5.2	4.8

Valore medio del sollevamento in mm.

5.00	5.08	4.90	5.06	5 54	5.16	5 20	5.00

Sollevamento dopo la disinfezione, facendo = 100 quello del saggio preliminare.

..	101.6	..	103.3	..	93.1	..	96.1

TABELLA IV.

Saggio comparativo della resistenza, compressibilità ed elasticità dei crini, non seccati e seccati a 108° C.

	Crini non disinfettati		Crini disinfettati per 1 ora a 100°		Crini disinfettati per 10' a 120°	
	Senza previo essiccamento	Tenuti a 108° per 40'	Senza previo essiccamento	Tenuti a 108° per 40', prima della disinfezione	Senza previo essiccamento	Tenuti a 108° per 40', prima della disinfezione
Resistenza. — Classificazione dei 20 crini saggiati, secondo il peso di rottura, fino a 1000 gr.	1	1	4	1	8	8
da > 1000 a 1200 gr.	9	5	6	8	9	6
da > 1200 a 1400 gr.	5	8	9	8	3	4
> 1400 gr.	5	6	1	3	0	2
Compressibilità dopo la disinfezione, facendo = 100 quella del saggio su crini non disinfettati (cfr. Tabella II).	100	100	160	140	210	170
Elasticità dopo la disinfezione, facendo = 100 quella del saggio su crini non disinfettati (cfr. Tab. III).	100	100	98.8	100.2	97.2	97.0

TABELLA V.

Penetrazione del calore nei crini secchi e umidi. — **Temperature segnate dal termometro col bulbo fasciato di crini (esposto al vapore a 100°, previo essiccamento o inumidimento) registrate di 10 in 10 secondi (Medie di 2 determinazioni).**

Tempi di osservazione in minuti secondi	Temperatura segnata dal termometro rimasto per 24h nell' essiccatore	Temperatura segnata dal termometro rimasto per 24h in ambiente umido	Tempi di osservazione in minuti secondi	Temperatura segnata dal termometro rimasto per 24h nell' essiccatore	Temperatura segnata dal termometro rimasto per 24h in ambiente umido
0	11.°5	12	240	84°	73.5
10	11.5	12	250	86	76
20	11.5	12	260	88	79
30	11.5	12	270	89.5	82.5
40	11.5	12	280	91.5	85
50	12	12	290	93.5	87.5
60	13	12	300	94.5	89.5
70	15	13	310	95.5	91
80	18.5	14	320	96	92.5
90	20	16	330	96	92.5
100	25	18.5	340	97	93.5
110	29	20.5	350	97.5	95.5
120	35	24	360	98.5	96
130	39	27	370	99	97
140	45	30.5	380	99.5	97.5
150	50	35	390	99.5	98
160	55	40	400	100	98.5
170	60	45	410	100	99
180	65.5	49	420	100	99.5
190	69	54	430	100	100
200	72	57	440	100	100
210	75	61.5	450	100	100
220	79.5	65.5	460	100	100
230	81	69.5	470	100	100

I filtri di porcellana d'amianto e la filtrazione delle acque potabili

per il dott. **CARLO TIRABOSCHI.**

In alcuni dei numerosi filtri costruiti per la filtrazione domestica delle acque potabili il materiale è di tale natura da trattenere solo le particelle sospese più grossolane, e da rendere così più o meno limpida l'acqua anche molto torbida. Altri filtri invece sono capaci di trattenere, almeno per un certo tempo, anche i germi contenuti nell'acqua da filtrare, cosicchè l'acqua filtrata non soltanto è perfettamente limpida, ma è anche sterile. Dopo qualche giorno però, anche i migliori filtri lasciano passare alcuni dei germi contenuti nell'acqua, donde la necessità di ripulirli e sterilizzarli frequentemente.

Per comprendere come questo possa accadere, non sarà inopportuno dire due parole sulla così detta *teoria dei filtri*.

Un filtro si chiama impermeabile ai germi, quando al principio della filtrazione non li lascia passare. E' noto da lungo tempo che tali filtri impermeabili non trattengono i germi perchè il diametro dei loro pori sia più piccolo di quello dei batteri contenuti nell'acqua; se così fosse, in un buon filtro impermeabile i germi non dovrebbero passare mai, perchè la loro marcia traverso la parete del filtro sarebbe sempre impossibile. Nei filtri invece i germi sono trattenuti per forza di adesione lungo le pareti dei pori-canali che si trovano nello spessore delle pareti del filtro, e così l'acqua nel traversare queste pareti abbandona tutti i germi che conteneva ed esce dal filtro sterile. Se però alcuni di questi germi acquatili sono capaci non soltanto di mantenersi a lungo vivi nell'acqua, ma anche di moltiplicarsi in essa, specialmente quando le condizioni di temperatura siano favorevoli ad un loro rigoglioso sviluppo, i germi che sono stati trattenuti alla superficie esterna del filtro e lungo le pareti dei pori si moltiplicano anch' essi e moltiplicandosi finiscono per

invadere via via tutti i pori del filtro e a passare dall'altra parte di esso, nell'acqua filtrata.

Che le cose stiano realmente così, lo dimostrano vari fatti, messi in evidenza da diversi esperimentatori e constatati tutti o quasi tutti anche da me nelle esperienze che riferirò in seguito:

1° I buoni filtri impermeabili trattengono per alcuni giorni tutti i comuni germi delle acque.

2° Dopo un certo numero di giorni, senza che nel filtro si siano mostrate le più piccole screpolature, alcuni germi cominciano a passare.

3° La rapidità e l'abbondanza con la quale determinati germi riescono ad attraversare un dato filtro varia col variare della temperatura, alla quale avviene la filtrazione; quanto più tale temperatura è vicina alla temperatura *optimum* per lo sviluppo del germe in questione, tanto più presto e in tanto maggior quantità, questo passa nell'acqua filtrata.

4° Il numero di germi contenuti nell'acqua filtrata va crescendo sempre più, fino a che diventa superiore, spessissimo anzi di gran lunga superiore, a quello dei germi contenuti nell'acqua da filtrare.

5° Se questa contiene parecchie specie di germi, questi non compaiono contemporaneamente nell'acqua filtrata; alcuni anzi non vi compaiono mai (ciò, naturalmente, dentro i limiti di tempo dell'osservazione), benchè nelle ordinarie condizioni siano anch'essi capaci di moltiplicarsi nell'acqua. Questo deve dipendere dal fatto che nello spessore delle pareti del filtro il loro sviluppo è ostacolato da quello straordinariamente rigoglioso ed esuberante di altre specie, che in quell'acqua e in quelle date condizioni di temperatura si moltiplicano più rapidamente.

6° Nelle comuni acque potabili i germi patogeni, pare che non siano capaci di moltiplicarsi, e quindi non dovrebbero passar mai traverso ad un buon filtro impermeabile. Secondo la maggior parte dei ricercatori, accadrebbe proprio questo fatto, secondo altri no; ritorneremo perciò sull'argomento, che è anche il più interessante di tutti, dal punto di vista della applicazione pratica.

7° Se all'acqua filtrante contenente un germe patogeno (bacilli del tifo o vibrioni del colera) si aggiunge del brodo anche in piccolissime quantità, così da costituire un terreno favorevole allo sviluppo del germe stesso, se tale sviluppo è inoltre favorito da una temperatura piuttosto elevata, anche i germi patogeni passano in gran numero e presto traverso al filtro.

8° Se si immerge un filtro (ad esempio una candela Chamberland o Berkefeld, col beccuccio rivolto in alto), in una solozione nutritiva qualunque (brodo o acqua peptonizzata), e si lascia che questa raggiunga lo stesso livello dentro e fuori del filtro, e poi dentro o fuori del filtro si versano delle colture pure o miste di germi diversi, e si mantiene il tutto a una temperatura conveniente, dopo un po' di tempo nella parte di soluzione nutritiva non inquinata si trovano i germi versati nell'altra parte, anche se questi germi sono per loro natura immobili. Il passaggio dunque dei germi traverso le pareti di un filtro non è compiuto dai germi stessi per la loro attività di movimento, nè è prodotto da correnti

determinate dalla pressione dell'acqua filtrante o da qualsiasi altra causa, ma deriva unicamente dal fatto che i germi crescono nella parete stessa filtrante. La pressione dell'acqua filtrante, la grandezza e mobilità dei germi, la temperatura, la specie del filtro e la struttura individuale di una candela filtrante, la qualità dell'acqua, la capacità maggiore o minore di un dato germe a moltiplicarsi in una data acqua, sono tutti fattori che possono influire sulla rapidità del passaggio dei germi traverso ad un filtro, ma questo passaggio *consiste* nella loro moltiplicazione.

9° Se si fanno delle sezioni sottili di candele Chamberland o Berkefeld, attraverso alle quali, dopo constatato il passaggio di una determinata specie batterica, si sia filtrata per 5-10 minuti una soluzione colorante di fucsina, i pori comunicanti con la superficie esterna della candela si vedono invasi dai batteri di quella stessa specie, colorati in rosso.

Si capisce così come i germi passino solo quando ci siano dei canali che attraversano tutta la parete della candela, come si possa parlare di struttura individuale di una candela e come a seconda di questa struttura varia la facilità con la quale i germi possono attraversarla.

***

Lasciando da parte i filtri più o meno permeabili ai germi (1), ci occuperemo qui solo di quelli relativamente impermeabili e cioè di quelli di caolino, di silice, di amianto e di sienite.

I primi filtri di porcellana costruiti sono quelli di *caolino*, che vanno sotto il nome di *Chamberland-Pasteur*. Sono fatti di porcellana porosa non verniciata e foggiati a forma di candela, lunga da 15 a 20 cm., con una cavità centrale nella quale si raccoglie l'acqua filtrata, giacchè la filtrazione si compie dall'esterno all'interno; l'acqua filtrata esce da un beccuccio di maiolica verniciata che si apre ad una estremità della candela; questa si adatta in un apposito manicotto metallico, avvitabile a sua volta alla condottura dell'acqua e munito di un rubinetto. Oltre le candele di Chamberland, sono in commercio quelle di *Ginori*, costruite sullo stesso identico tipo, ma più economiche, a parete filtrante un po' più sottile, e a pasta più compatta e più omogenea. Vi sono poi altri filtri di porcellana, come per esempio quelli di *Maassen*, quelli di *Pukall*, ecc. Ricorderò infine quello di *Woolworth*, consistente in un tubo di porcellana rivestito di uno strato di idrossido d'alluminio, unito alla porcellana per mezzo di cotone minerale.

---

(1) Ricorderò tra questi filtri, che lasciano passare con l'acqua anche i batteri fin dall'inizio della filtrazione o subito dopo, quelli fatti di carbone (carbone plastico di storta, polvere di carbone fina, polvere di coke, ecc), di arenaria o di tufo, di carta, di spugna di ferro, ecc. Si possono mettere in questa categoria anche i filtri di argilla, i quali trattengono i germi solo per brevissimo tempo, tanto più breve quanto maggiore è il loro rendimento.

I filtri di materiale siliceo, detti anche di *farina fossile* e più comunemente ancora di terra di infusori (1), vanno sotto il nome di *Berkefeld*; sono foggiati sullo stesso tipo di quelli di Chamberland, ma le candele Berkefeld costano di più di quelle Chamberland ed hanno le pareti più grosse.

Dello stesso tipo sono anche alcuni dei filtri di *amianto*, detti anche di porcellana d'amianto. Tra i filtri d'amianto ve ne sono infatti altri, costituiti da amianto finamente sfibrillato, compresso e ridotto in forma di poltiglia, o mescolato con altro materiale, ad esempio con carbone; la maggior parte di questi filtri però non sono impermeabili ai germi o danno acqua sterile solo per brevissimo tempo. Buoni filtri impermeabili ai germi sono invece quelli foggiati a candela, tipo Chamberland, adattabile in un manicotto metallico e fatta di amianto finamente polverizzato, impastato e cotto come il caolino a formare una specie di porcellana porosa, detta appunto porcellana d'amianto. Tali candele sono quelle che vanno sotto il nome di candele *Malliè*, e la loro porcellana pare che sia più fina di quella delle candele Chamberland, e a pori più piccoli e più regolari.

I filtri di *sienite*, sono quelli ungheresi che vanno sotto il nome di filtri *Delfin*, fatti di un miscuglio di polveri finissime di sienite e di quarzo, anch'esse impastate e cotte a formare una porcellana porosa.

***

Numerose sono le esperienze fatte coi filtri di Chamberland e di Berkefeld, dirette a stabilire se e per quanto tempo essi siano capaci di dare acqua sterile e se i germi patogeni eventualmente contenuti nell'acqua potabile non siano mai capaci di traversarne le pareti. I risultati, a dire il vero, non sono molto concordi. La maggior parte degli sperimentatori però hanno concluso che tali filtri possono trattenere tutti i germi contenuti nell'acqua da filtrare per alcuni giorni; solo alcuni pochi sperimentatori han trovato che possono trattenerli più a lungo. Questa diversità di risultati può dipendere in parte anche da errori o da imperfezioni di tecnica (1), ma può anche spiegarsi col fatto delle indivi-

---

(1) In tutti i trattati e in tutte le memorie di autori tedeschi essi sono indicati col nome di *Kieselguhrfilter aus Infusorienerde*, cioè « filtri di farina fossile, fatti con terra di infusori ». La farina fossile, di cui in Italia esistono importanti depositi al Monte Amiata, è un ammasso di scheletri di Diatomee (Alghe); questi scheletri sono di natura silicea: frammenti di questi scheletri si vedono esaminando al microscopio la polvere che si ottiene triturando un pezzettino della pasta di cui sono formate le candele Berkefeld. Il nome di « terra di infusori » è molto vago e anzi, dal punto di vista scientifico, sbagliato. Infatti oggi col nome di Infusori non solo non comprendiamo più le Diatomee, ma neppure i Radiolari (Protozoi), i cui scheletri, pure essi di natura silicea (o anche chitinosa) costituiscono la roccia silicea conosciuta sotto il nome di « tripoli ».

duali variazioni da candela a candela di cui ho fatto cenno sopra o anche col fatto che la rapidità di sviluppo dei germi acquatili nell'acqua e quindi la rapidità con la quale essi possono passare traverso ad un buon filtro impermeabile, varia col variare della qualità dell'acqua filtrante e dei germi in essa contenuti e sopratutto col variare della temperatura alla quale la filtrazione ha luogo, e di quest'ultimo dato importantissimo molti sperimentatori non han tenuto nessun conto, cosicchè i loro risultati non sono attendibili.

Troppo lungo sarebbe riassumere tutte le esperienze fatte coi filtri Chamberland e Berkefeld ed esposte nei lavori citati nella bibliografia. Dirò solo poche parole di quei lavori che mi sembrano più importanti per le conclusioni alle quali giungono.

Per quel che riguarda i *filtri Chamberland*, tra gli sperimentatori che li trovarono buonissimi, cioè capaci di dare per molti giorni acqua sterile, ricorderò Miquel (1885), Prochnik (1892), Freudenreich (1892), de Haan e Straub (?) (1895) etc. Miquel (XXVIII e XXIX) filtrava l'acqua della Senna alla pressione di 1/3 circa d'atmosfera; la temperatura non è indicata; per 6 giorni almeno (non proseguì le sue ricerche più oltre) egli ottenne acqua completamente sterile, tanto che versandone, all'inizio, verso la metà, e alla fine della filtrazione, quasi 1 litro in palloni di brodo, mantenuti alla temperatura di 30° a 35°, non constatò mai l'intorbidamento del brodo stesso. Uguali risultati ottenne con acqua dell'Ourcq, alla pressione di 3 atmosfere. Egli fece inoltre un'esperienza ancora più impressionante: in un gran recipiente di vetro sterilizzato e contenente del brodo concentratissimo lasciò cadere una volta 32 litri e un'altra volta 35 litri d'acqua filtrata, senza constatare mai, neppure dopo molti giorni di esposizione a 30°-35°, il più piccolo intorbidamento del brodo. Prochnik, (XXXIV) filtrando l'acqua della condottura di Vienna, ottenne acqua sterile per 23 giorni (2). Freudenreich (XI) constatò che l'acqua si manteneva sterile per otto giorni almeno; questo era il *minimum*, che otteneva anche quando la filtrazione non era continua oppure era lentissima, e ciò perchè facendo egli le esperienze in una cucina, l'acqua che arrivava con una temperatura massima di 13° C. si riscaldava di più e così lo sviluppo dei germi era più rapido e rigoglioso; invece con una candela nuova, attraverso la quale la filtrazione era veloce, l'A. trovò che anche nei mesi di maggio e di giugno l'acqua filtrata si manteneva sterile per 24 giorni.

Tra gli autori invece che ottennero cattivi risultati coi filtri Chamberland, citerò Kubler (1890), Acosta e Rossi (1892), Giltay e Anderson (1892), Lacour (1892) ecc. Kubler filtrava l'acqua della condottura di

(1) Vedremo infatti in seguito come alcuni sperimentatori abbiano esposto i terreni culturali, in cui avevamo seminato i campioni d'acqua filtrata, a una temperatura troppo elevata, non favorevole quindi allo sviluppo di alcuni batteri acquatili e come perciò abbiano potuto giudicare sterile un' acqua che forse non era tale.

(2) Vedi la critica fatta da Kirchner (XVIII) alle esperienze e alle conclusioni di Prochnik.

Berlino traverso ad una batteria di tre candele e otteneva acqua sterile soltanto per tre o quattro giorni, tanto se la filtrazione era interrotta (1), quanto se essa aveva aveva luogo soltanto per 1/2 ora fino a 5 ore al giorno. Quanto alla temperatura, questa non è espressamente riportata; le esperienze, quattro soltanto, furono fatte, tre in febbraio e marzo, e una in agosto; in quest'ultima, a filtrazione quasi continua, i germi comparvero al 4° giorno nell'acqua filtrata e aumentarono rapidissimamente di numero al 5° e al 6° giorno (da 12 a 1370, a innumerevoli); in quella di marzo, a filtrazione pure continua, i germi comparvero prima, cioè fin dal 2° giorno, ma andarono aumentando di numero lentamente (da 13 a 35, 49, 44, 420, 3080, innumerevoli). Quanto poi alle specie dei germi, prima passava solo il bacillo acquatile fluorescente, mobile e liquefacente, poi tutte le altre specie batteriche. Lacour XXIV) dice che le candele Chamberland possono dare acqua perfettamente sterile purchè siano pulite e sterilizzate ogni tre giorni e purchè la pressione dell'acqua filtrante non superi di molto 1 atmosfera.

Riferirò anche le esperienze dell'Abba (I; 1895), sia perchè esse sono, a quanto mi sappia, le uniche esperienze pubblicate in Italia relativamento alla filtrazione domestica, sia perchè l'Abba ha esperimentato non solo con candele Chamberland ma anche con quelle tipo Chamberland fabbricate da Ginori e di cui ho fatto un cenno più sopra, e che egli trovò «di qualità superiore o per lo meno uguale a quelle delle migliori fabbriche estere». La temperatura dell'acqua filtrante (acqua della condottura di Torino) variò nelle diverse serie di esperienze da 15° a 24° C., la pressione era sempre di 1 atmosfera. A temperature piuttosto alte, una volta (a 19°-22° C.) riscontrò dei germi nell'acqua filtrata già al 7° giorno e in gran numero (più di 300 per cm.) dopo 11 giorni; un'altra volta (a 22°-24° C.) ne riscontrò solo dopo 20 giorni e in gran numero (più di 100 per cmc.) solo dopo 28 giorni. A temperature più basse, una volta (a 15°-17° C.) li riscontrò già dopo 9 giorni e in gran numero dopo 11 giorni, un'altra volta (a 16°-18° C.) non ne riscontrò neppure dopo 25 giorni. I risultati sono quindi variabilissimi da candela a candela (2) ed è solo per una determinata candela che l'A. ha potuto constatare che le alte temperature influiscono sulla rapidità del passaggio dei germi e sulla quantità di essi. I germi che passano appartengono ad una o due specie soltanto anche quando le specie dei germi contenuti nell'acqua sono parecchie.

Quanto ai filtri di Maassen e di Pukall, dirò solo che Pfuhl (XXXIII) li ha trovati tutti e due permeabili ai germi, i primi più dei secondi.

Quanto infine ai filtri di Woolvorth, le uniche esperienze di cui io ho trovato nota, sono quelle di Gorham (XIV), il quale avrebbe trovato che questi filtri dopo più di un anno di funzionamento (?) danno ancora acqua sterile.

---

(1) Veramente, anche in quella che l'A. chiama filtrazione durava da 19 a 23 ore al giorno e quindi si capisce come egli non trovasse grandi differenze nei risultati.

(2) L'A. veramente non arriva a questa conclusione, ma a me pare che essa possa dedursi facilmente dai dati che egli espone nelle sue lunghe tabelle e che io ho messo in evidenza più sopra.

Per quel che riguarda i *filtri Berkefeld*, le esperienze sono ancora più numerose e più contradittorie. Tra quelli che li hanno trovati capaci di dare acqua sterile per molti giorni, ricorderò Prochnik (1892), Koettstorfer, de Haan e Straub (?) (1895) ecc. Prochnik (XXXIV), filtrando a 8°-12° C. un'acqua che conteneva da 100 a 300 germi per centimetro cubico otteneva acqua sterile per 38 giorni almeno (1), Köttstorfer (XX), filtrando alla temperatura di (?) da 200 a 300 litri al giorno di acqua alla pressione di atmosfere 4 1/2, otteneva acqua sterile perfino dopo 52 giorni.

In maggior numero sono gli sperimentatori che hanno trovato i filtri Berkefeld capaci di dare acqua sterile solo per pochissimi giorni. Nordtmeyer (1891, XXXI) filtrava l'acqua della condottura di Breslavia, alla pressione di atmosfere 3 a 3 1/2 e siccome l'acqua da filtrare conteneva pochissimi germi, prima di ogni esperienza versava nella intercapedine fra la candela e il manicotto metallico un liquido ricchissimo di germi (infuso di fieno, di foglie ecc.) (2). L'acqua filtrata, prima di essere seminata nelle capsule Petri, stava al caldo per 1-2 ore, qualche volta anche per 24 ore. Finchè la temperatura fu bassa, l'acqua filtrata si conservò sterile per delle settimane; fra 8° e 14° C. per 6-10 giorni; a 25° C., l'acqua filtrata conteneva dei germi già dopo 3 giorni. Lubbert (1891, XXV) dice che anche in condizioni sfavorevoli i germi non compaiono mai prima di tre giorni. Weyl (1892, XL) filtrando l'acqua della condottura di Berlino otteneva acqua sterile per tre giorni almeno e con la pulitura almeno per 6 giorni (3), Kirchner (1893, XVIII) filtrava un'acqua poverissima di germi, alla pressione di 3-4 atmosfere, e non ottenne mai acqua sterile, ma solo una diminuzione del quantitativo batterico; anche se filtrava dell'acqua senza pressione, nell'acqua filtrata trovava subito o dopo qualche giorno dei germi. Jolin (1894, XXIII) otteneva per alcuni giorni acqua sterile; poi, tanto più presto quanto più alta era la temperatura, passavano molti germi e nell'acqua filtrata se ne trovavano di più che in quella da filtrare; se questa poi era molto impura, i germi passavano già dopo due giorni, anche se la pressione era minima. Schüder (1903, XXXVI) dice che i germi compaiono nell'acqua filtrata al più tardi dopo 4 giorni; di estate, specialmente se l'acqua è ricca di germi, compaiono già dopo 1 giorno. Pfuhl (1903, XXXIII) filtrava dell'acqua di condotta, alla pressione di atmosfere 2 3/4, versando nell'intercapedine una emulsione di una coltura in agar di un vibrione fosforescente e di un *Bacterium coli*, raccoglieva il 1° litro di acqua filtrata in un pallone contenente 100 cmc. di acqua peptonizzata al 10 0/0 e di ognuno dei successivi nove litri raccoglieva 100 cmc. in un palloncino con 10 cmc. della stessa acqua pepto-

(1) Vedi la critica che alle conclusioni di Prochnik fa il Kirchner (XVIII).

(2) In un altro punto del lavoro l'A. dice che il comparire dei batteri nell'acqua filtrata non sta in nessun rapporto col numero dei germi contenuto nell'acqua da filtrare. Inoltre il filtro veniva ogni giorno ripulito esternamente; non comprendo quindi il perchè dell'aggiunta d'infuso di fieno ecc.; meglio era lasciare filtrare l'acqua senza aggiunger nulla e senza pulire tutti i giorni il filtro.

(3) Anche per quel che riguarda Nordtmeyer, Lubbert e Weyl vedi la critica di Kirchner (XVIII).

nizzata; teneva per un giorno i palloni a 37° C. e poi da quelli intorbidati raccoglieva saggi per l'esame microscopico e per strisci su piastre di agar comune nel caso del vibrione fosforescente o di agar Drigalski nel caso del *Bacterium coli*. Dei 10 filtri esaminati, solo 5 si mostrarono impermeabili a questi germi; degli altri 5, per alcuni i germi furono riscontrati in tutti e dieci i litri di acqua filtrata, per altri solo in alcuni. Bisogna quindi provare i filtri uno per uno, saggiandone il filtrato litro per litro, a cominciare dal primo. Esmarch (1902, IX) ha dimostrato come i germi traversino le grosse pareti delle candele Berkefeld, indipendentemente dalla loro mobilità e dalle correnti di pressione ecc. dell'acqua filtrante; con sezioni sottili ha dimostrato come varii la struttura da candela e candela e come tale varietà di struttura spieghi il comportamento diverso, rispetto al passaggio dei germi, di candele diverse di uno stesso tipo (vedi pag. 625).

Scarse sono invece le esperienze relative ai *filtri Malliè* di porcellana d'amianto. Nella letteratura scientifica che io ho esaminato, anzi, le uniche esperienze che ho trovate descritte sono quelle eseguite da Pelzl (1902, XXXII); non ho potuto procurarmi il periodico scientifico in cui questo autore ha pubblicato i risultati delle sue ricerche, e dai riassunti fatti in altri periodici non ho appreso altro che questo: che cioè il Pelzl ha trovato che i filtri Malliè non lasciano passare i germi per lungo tempo. Il Main (1901, XXVII), che ha fatto delle esperienze sul rendimento dei filtri Malliè, riferisce che nel laboratorio municipale di Parigi, l'acqua che conteneva 600 germi per cmc., filtrata traverso a una candela Malliè, fu trovata completamente sterile (dopo quanto tempo e a quale temperatura?) (Dott. Girard, 1892), e che nel laboratorio di Tossicologia dell'Università di Parigi, l'acqua proveniente dall'acquedotto della città (acqua della Vanne) e contenente 1200 germi per cmc., filtrata, fu trovata assolutamente priva di germi (dopo quanto tempo e a quale temperatura?), e che anzi, dopo sei settimane di continua filtrazione attraverso a una *sfera* (?) di porcellana d'amianto, le prove di coltura su gelatina non diedero luogo ad alcuna colonia di batteri (Dott. Durand-Fardel e Bordas; 1892). Questi risultati ottenuti nei due laboratori francesi sono riportati anche nel libro *réclame* della Società fabbricatrice dei filtri Malliè, dal quale tolgo questi altri dati: Miquel, che già ho citato per le sue esperienze coi filtri Chamberland (v. pag. 627), avrebbe trovato che l'acqua del fiume Ourcq, dopo 12 giorni di filtrazione continua traverso a un filtro Malliè, è ancora perfettamente sterile e così pure l'acqua della Dhuis (pressione di 3 atmosfere e più) dopo 30 giorni di continua filtrazione (a quale temperatura?) (1).

Quanto ai *filtri «Delfin»* di sienite, riferirò soltanto che Strössner (1901, XXXVIII) trovò che essi danno un filtrato sterile per 5 giorni almeno e Pelzl (1902, XXXII) per 10 giorni.

---

(1) Ho riferito tutti questi risultati più a titolo di curiosità che d'altro. Non solo infatti mancano nella relazione di queste esperienze i dati relativi alla temperatura di filtrazione e per alcune anche il numero dei giorni per i quali si è prolungata l'esperienza e l'acqua sarebbe stata trovata sterile, ma non essendo questi risultati stati pubblicati in un lavoro scientifico non meritano di essere presi in considerazione.

***

Quanto al *passaggio dei germi patogeni* traverso alle candele Chamberland e Berkefeld, la maggior parte degli sperimentatori hanno concluso che tali germi patogeni (bacillo del tifo e vibrione del colera), non essendo capaci di moltiplicarsi nelle comuni acque potabili, non riescono mai ad attraversare le pareti di un buon filtro impermeabile; solo alcuni pochi hanno sostenuto il contrario. Ricorderò tra questi ultimi Kirchner (1893, XVIII), il quale però faceva le sue esperienze aggiungendo all'acqua da filtrare delle brodocolture *fresche* di bacilli del tifo, o di vibrioni del colera, o anche di stafilococchi piogeni aurei. In una prima serie di esperienze anzi egli versò senz'altro tali brodocolture (diluite con acqua sterilizzata nella proporzione di 1 a 29) nell'intercapedine fra il manicotto metallico e una candela Berkefeld (tutto l'apparecchio era sterilizzato) e senza far passare dell'acqua determinò la filtrazione mediante aspirazione; la temperatura era di 17° C. e la pressione 2/3 circa d'atmosfera; dopo 24 ore i vibrioni del colera e gli stafilococchi erano numerosissimi nel filtrato e dopo 3 giorni anche i bacilli del tifo. In una seconda serie di esperienze Kirchner aggiungeva le brodocolture nella proporzione di 1 a 10 a dell'acqua (acqua dell'Ihme) contenente circa 30.000 germi per cmc.; il vibrione del colera fu trovato nell'acqua filtrata dopo 24 ore, ma non dopo 48 ore, dopo il qual tempo esso era scomparso anche dall'acqua filtrante; il bacillo del tifo fu riscontrato nell'acqua filtrata dopo 2 e dopo 3 giorni e la ricerca non fu più oltre proseguita. All'obbiezione di Gruber (1893, XV) che così facendo egli trasformava artificialmente in un terreno favorevole allo sviluppo di quei germi patogeni un'acqua che nelle sue naturali condizioni non ne avrebbe permesso la moltiplicazione, il Kirchner (1893, XIX) rispondeva che questi germi possono moltiplicarsi anche nell'acqua, perchè aderiscono alle particelle sospese, in cui trovano il loro nutrimento; essi perciò possono tanto più facilmente e rapidamente moltiplicarsi alla superficie e nello spessore del filtro, dove tali particelle sospese restano trattenute ed accumulate; per i vibrioni del colera occorrerebbe una temperatura di 15°-16° C. almeno, per i bacilli del tifo basterebbe una temperatura anche più bassa,

Poco dopo questa risposta del Kirchner, che mi sembra tutt'altro che esauriente perchè non dava la dimostrazione di fatto del passaggio dei germi patogeni traverso a un buon filtro nelle condizioni naturali di filtrazione, sullo stesso periodico scientifico usciva il lavoro di Schöfer (1893, XXXV), il quale, aggiungendo a dell'acqua accuratamente sterilizzata delle emulsioni di colture vive di bacilli del tifo e filtrando traverso a candele Berkefeld (sterilizzate insieme col loro manicotto?) alla temperatura di 19°-26° C,, non constatò mai, neppure dopo 15 giorni di filtrazione, il passaggio di tali bacilli; aggiungendo i vibrioni del colera e filtrando a 18-24° C., non li riscontrò nell'acqua filtrata neppure dopo 25 giorni, per quanto la temperatura fosse favorevole al loro sviluppo e per quanto favorevole fosse puro la condizione della esclusione dei germi acquatili i quali col loro sviluppo avrebbero potuto ostacolare quello dei due germi patogeni. Bisogna però notare che Schöfer filtrava dell'acqua bollita per più di sei ore e quindi alterata nella sua composizione e questa obbieziono

non mi sembra distrutta dal fatto che in una serie di esperienze lo Schöfer, prima di aggiungere l'emulsione di bacilli del tifo, faceva filtrare sette litri di acqua allo scopo di accumulare alla superficie del filtro le particelle sospese; in questa esperienza egli non riscontrò i bacilli del tifo nell'acqua filtrata neppure dopo 24 giorni (a 18°-25° C.). Interessanti sono le esperienze fatte dallo stesso Schöfer aggiungendo all'acqua da filtrare un po' di brodo, in una proporzione inferiore a 1 %; due, tre, quattro, cinque giorni dopo tale aggiunta, e aggiungendo al 2° e al 4° giorno dell'altra acqua con brodo, egli riscontrò nell'acqua filtrata 16, 195, 2336, 16430 bacilli del tifo per cmc; se invece non aggiungeva dell'altro brodo, i bacilli del tifo andavano via via diminuendo nell'acqua filtrata, anche se in quella da filtrare versava altre emulsioni di bacilli del tifo.

Tra quelli che hanno sostenuto la possibilità del passaggio dei germi patogeni traverso alle candele Chamberland o Berkefeld, ci sarebbero anche, oltre il Kirchner, Cambier e Pfuhl. Quanto a Cambier (1901, V), farò osservare che egli constatò il passaggio dei bacilli del tifo, in poche ore, traverso a delle candele di porcellana che non descrive e non indica esattamente; anzi per quel che riguarda le candele Chamberland, egli dice espressamente di non aver constatato il passaggio dei bacilli del tifo traverso a quelle di marca B. Quanto a Pfuhl poi (1903, XXXIII), che ha sperimentato con le candele Berkefeld, dirò che invece del vibrione del colera ha aggiunto all'acqua da filtrare un vibrione fosforescente acquatile e invece del bacillo del tifo quello del coli; inoltre, come ho già riferito (v. p. 629 e 630), le sue esperienze si sono limitate a dimostrare che non tutte le candele Berkefeld sono ugualmente impermeabili ai germi; in quelle da lui trovate impermeabili (5 su 10), egli non constatò il passaggio del vibrione e del *b.* coli nei primi 10 litri di acqua filtrata.

Tra gli autori che, oltre lo Schöfer, han trovato i filtri Berkefeld capaci di trattenere i batteri patogeni eventualmente contenuti in un'acqua potabile, ricorderò Nordtmeyer (1891, XXXI), Lübbert (1891, XXV) e Lunt (1898, XXVI). Lübbert dice che i germi patogeni (vibrione del colera, bacillo del tifo e della difterite, stafilococco piogene aureo) non passano mai, perchè ostacolati nel loro sviluppo dai germi acquatili. Lunt aggiunge che i filtri devono esser tenuti puliti e ogni tanto sterilizzati. Nordtmeyer versava nell' intercapedine fra il manicotto e la candela delle emulsioni di colture pure di bacilli del tifo e di stafilococchi; non riscontrò mai nelle piastre seminate con acqua filtrata una sola colonia di questi germi, ma arrestò le sue ricerche appena constatò nell'acqua filtrata la presenza di batteri acquatili.

Per quel che riguarda i filtri Chamberland, dirò che l'Abba (1895, I), il quale ha fatto tali esperienze solo con le candele Ginori, ha trovato che i germi patogeni da lui esaminati (vibrioni del colera, bacilli del tifo e b. coli) non soltanto non passano mai nell'acqua filtrata, ma anzi scompaiono rapidamente nell'acqua del manicotto metallico avvolgente la candela (1). L'A. però non riferisce a quali temperature ha fatto le sue espe-

(1) I vibrioni del colera scompaiono già dopo 1 giorno, i bacilli del tifo dopo 1-2 giorni, quelli del coli dopo 3-4 giorni. Nell'acqua stagnante di un pallone invece, sempre secondo l'Abba, essi resisterebbero rispet-

rienze (1). Inoltre egli esperimentava in condizioni sfavorevolissime allo sviluppo dei germi patogeni e al loro passaggio traverso alle pareti del filtro; infatti egli versava emulsioni di colture dei suddetti germi nell'acqua circostante a delle candele filtranti che avevano già funzionato per parecchi mesi senza essere mai ripulite. In tali condizioni l'acqua filtrata e più ancora quella circostante alla candela contenevano una quantità innumerevole di germi, i quali dovevano naturalmente ostacolare lo sviluppo dei germi patogeni. Inoltre i pori della candela dovevano già essere tutti invasi dai batteri delle specie (una o due soltanto, secondo l'Abba) che già da molto tempo vi si erano moltiplicati e passavano nell'acqua filtrata ed era quindi anche meccanicamente ostacolato l'eventuale passaggio dei germi patogeni traverso alla parete della candela (2). Per tutte queste ragioni quindi mi sembra che non si possano elevare al valore di leggi generali le conclusioni che l'Abba ritrae dalle sue esperienze.

Per quel che si riferisce ai *filtri Mallié*, di porcellana d'amianto, nulla ho trovato in proposito nella letteratura scientifica da me consultata; solo dirò, a titolo di curiosità, che, stando a quanto è scritto nel *libro-réclame* della Società fabbricatrice di questi filtri, Miquel avrebbe trovato che i vibrioni del colera sono trattenuti (per quanto tempo e in quali condizioni di esperimento?).

***

Di fronte alla scarsità delle esperienze relative ai filtri di porcellana d'amianto e sopratutto di quelle dirette a stabilire la loro capacità a trattenere i germi patogeni eventualmente contenuti in un'acqua potabile (3), il prof. Canalis ha stimato opportuno eseguire delle ricerche

---

tivamente 7, 12 e 20 giorni, e perciò l'A. emette l'ipotesi che la pressione (che del resto nell'acqua filtrante da lui adoperata era solo di 1 atmosfera) coadiuverebbe la concorrenza vitale dei germi acquatili. Mi sembra che l'A. non tenga conto del fatto che nell'acqua filtrante del manicotto i germi acquatili erano in numero enorme.

(1) Solo si deduce dal suo lavoro che tali esperienze furono fatte alcune nel mese di gennaio (e quindi a temperatura bassa) e altre nel mese di maggio e al principio di giugno (quindi a temperatura abbastanza elevata).

(2) Che in tali condizioni il passaggio dei germi patogeni aggiunti all'acqua filtrante sia reso molto difficile, se non impossibile, risulta da quello che dirò in seguito a proposito delle mie esperienze col bacillo della dissenteria.

(3) Abbiamo visto nel riassunto bibliografico che le uniche esperienze pubblicate in un periodico scientifico, le sole quindi che in un lavoro scientifico meritino di essere prese in considerazione, sono quelle di Pelzl (vedi pag. 630) e queste non si riferiscono alla possibilità o meno del passaggio dei batteri patogeni traverso al filtro Malliè. Questa ultima questione del resto, per quello che già ho detto e per quello che dirò più particolareggiatamente in seguito, meritava di essere trattata da un punto di vista più generale, cioè non soltanto in rapporto ai filtri Malliè, ma a tutti i filtri costruiti sullo stesso tipo (filtri Chamberland, Ginori, Berkefeld, ecc.), e anzi a tutti i filtri in genere.

in proposito e me ne ha affidata l'esecuzione; della qual cosa, e ancora più dei suggerimenti e consigli che mi ha dato, pubblicamente lo ringrazio.

***

Anzitutto ho voluto ricercare se e per quanto tempo questi filtri Malliè fossero capaci di trattenere tutti i germi contenuti in un'acqua, estendendo queste ricerche per un lungo periodo di tempo, in stagioni diverse e quindi in condizioni di temperatura più o meno favorevoli allo sviluppo dei comuni germi acquatili e conseguentemente al loro passaggio traverso alle pareti del filtro. Ho voluto anche vedere se la pressione esercitasse un'influenza sulla rapidità con la quale i germi dell'acqua riescono a traversare il filtro e infine se la capacità di una data candela a trattenere per un tempo più o meno lungo tutti i germi contenuti in un'acqua fosse, a parità di condizioni di temperatura e di pressione, diversa per acque potabili diverse. Se si pensa infatti che la flora batterica delle differenti acque potabili è diversa e che la rapidità di sviluppo dei germi acquatili in una determinata acqua varia moltissimo da specie a specie, se si tien conto inoltre del fatto che lo sviluppo nell'acqua di una determinata specie batterica varia a seconda della composizione chimica dell'acqua e della quantità e natura delle particelle in essa sospese, si capisce come la determinazione della capacità di filtrazione dei germi di una data candela, esperimentata con una data acqua potabile, non valga a stabilire la capacità di filtrazione batterica della stessa candela per tutte le acque potabili in genere. Ecco perchè con le candele Malliè io ho esperimentato con tre acque diverse, tutte e tre condottate e destinate alla alimentazione idrica della città di Genova, e cioè l'acqua del Gorzente, altrimenti detta De Ferrari-Galliera, quella dell'acquedotto civico e quella dell'acquedotto Nicolay.

In una prima serie di esperimenti (tabella 1ª, 2ª, 3ª) il manicotto metallico avvolgente la candela filtrante era collegato per mezzo di un tubo di gomma al rubinetto dell'acqua potabile del Gorzente; la differenza di livello fra i serbatoi di questa acqua e il filtro era di m. 6 ½, cioè la pressione dell'acqua era quasi di $^2/_3$ d'atmosfera. Però per evitare che il tubo di gomma fosse distaccato in uno dei suoi due punti d'attacco, lasciavo il rubinetto dell'acqua appena aperto; la rapidità di filtrazione dell'acqua era quindi molto piccola. Inoltre in questa prima serie di esperienze si verificò spesso l'inconveniente della mancanza dell'acqua, dovuto al fatto della straordinaria siccità dell'anno 1904; l'acqua era distribuita a intervalli, cosicchè il filtro restava spesso qualche ora, o una intiera giornata o anche due e perfino tre giornate senza funzionare.

Noterò anche che l'acqua del Gorzente, la quale è ordinariamente torbida, in quei giorni era forse ancora più torbida del solito. In una seconda serie di esperienze (tabella 4ª e 5ª) il manicotto metallico col suo rubinetto era innestato direttamente al tubo della condottura d'acqua del Gorzente, con una differenza di livello dai serbatoi di 11 metri; la pressione era quindi di poco più di una atmosfera: l'acqua fu generalmente meno torbida che nelle esperienze della prima serie; essa inoltre non venne mai a mancare cosicchè la filtrazione fu ininterrotta. In una terza serie di esperienze (tabella 6ª e 7ª) il manicotto metallico per mezzo di un tubo di gomma era collegato a un rubinetto d'acqua dell'acquedotto civico; non ho potuto in questo caso misurare la pressione dell'acqua, ma ho potuto constatare dalla rapidità di filtrazione che essa era bassissima; l'acqua era limpida. Infine nelle successive esperienze (tabella 8ª, 9ª, e 10ª) la custodia metallica era collegata, per mezzo di un tubo di gomma e di un sifone, a un bottiglione d'acqua alto 30 centimetri, posto 75 centimetri più in alto del filtro; la pressione dell'acqua era quindi di $^1/_{10}$ di atmosfera circa, quando il bottiglione era pieno d'acqua (dislivello di m. 1.05 circa); poi mano a mano che il bottiglione si vuotava, la pressione diminuiva fino a scendere a 1/14 soltanto di atmosfera quando il bottiglione era vuoto o quasi (dislivello di m. 0.75 circa). Nell'esperienza della tabella 8ª che durò solo 14 giorni non fu necessario riempire di nuovo il bottiglione nel corso dell'esperienza e quindi la pressione andò gradatamente scendendo da 1/10 a 1/14 di atmosfera; in quella della tabella 9ª, prolungata per 30 giorni, la pressione nei primi 18 giorni andò gradatamente scendendo da 1/10 a 1/14 di atmosfera, poi, riempito di nuovo il bottiglione, risalì a 1/10 per poi scendere gradatamente fino a 1/13 circa (dislivello di m. 0.80 circa); infine nell'esperienza della tabella 10ª, prolungata per 31 giorni, la pressione fu mantenuta costantemente a 1/10 di atmosfera, aggiungendo tutti i giorni dell'acqua nel bottiglione, così da mantenere questo sempre pieno.

La tecnica con la quale ho proceduto nelle singole esperienze fu la seguente:

Nel manicotto metallico introducevo una candela, sterilizzata al calor secco per un'ora circa, a 160°-170° C.; il beccuccio della candela era coperto da un po' di cotone grezzo, tenuto in sito da un pezzettino di carta da filtro, legata con uno spago in modo da formare con il cotone un cappuccio che impedisse la penetrazione dei germi dell'aria nell'interno della candela. Questo cappuccetto era fatto in modo che la candela poteva essere fissata dentro al manicotto senza bisogno di togliere il cappuccetto.

Nella sterilizzazione tutta la candela era avvolta in carta da filtro, che toglievo solo al momento di introdurre la candela stessa nel manicotto. Se la candela era già stata adoperata, prima di sterilizzarla nella stufa a secco, la pulivo accuratamente sotto un getto d'acqua e poi la lasciavo per qualche giorno immersa in una soluzione al 10 % d'acido acetico, seguendo in ciò la pratica introdotta dall'Abba (I); con la sterilizzazione al calor secco, tutte le traccie di acido acetico naturalmente scomparivano. Noterò qui che la sterilizzazione al calore secco, che può riuscire pericolosa per le candele Chamberland e Berkefeld, nelle quali si

producono facilmente delle screpolature che rendono la candela stessa permeabile subito a tutti i germi, non presenta invece nessun pericolo per le candele Mallié, purchè naturalmente la temperatura di 170° C. sia raggiunta gradatamente, poco a poco. In alcune candele che io ho sottoposto ripetutamente, per molte e molte volte, a tale sterilizzazione, io non ho mai potuto constatare il più piccolo guasto.

Qualche volta, per rinnovare il potere filtrante di una candela usata, ricorrevo alla sola pulitura esterna e successiva sterilizzazione a secco; ma avendo constatato che in tal caso il potere filtrante restava sensibilmente diminuito, facevo quasi sempre precedere il bagno nella soluzione acetica. Altri procedimenti in uso per rinnovare il potere filtrante di una candela usata sono l'immersione in una soluzione di acido cloridrico, la ebollizione in acqua o meglio in una soluzione di soda al 2 % ecc., metodi che io non ho provato, avendo senz'altro adottato quello consigliato dall'Abba e che ho trovato buono per il mio scopo, in quanto che alla immersione nella soluzione acetica facevo seguire la sterilizzazione a 170°. Nella pratica famigliare però, l'uso della soluzione di acido acetico mi sembra pericoloso per la difficoltà di togliere poi l'acido acetico di cui le pareti della candela restano impregnate. L'Abba propone di non raccogliere i primi due o tre litri di acqua filtrata; io ho osservato che ciò non basta per togliere all'acqua ogni sapore di aceto e che inoltre alla bocca del manicotto metallico si formano delle incrostazioni verdi di acetato di rame, il quale trasportato nell'acqua filtrata può renderla pericolosa per l'uso potabile. Nella pratica famigliare sarà quindi meglio attenersi alla bollitura nell'acqua, previa pulitura della candela sotto un getto d'acqua; con ciò si ha l'inconveniente che il rendimento della candela usata diminuisce più fortemente, ma non si corre il pericolo di restare avvelenati dall'acqua. O meglio ancora, invece di bollire in acqua semplice, si potrà ricorrere alla soluzione di soda al 2 %, che secondo Dserschgowski (VII) mantiene, per molte successive filtrazioni, il rendimento delle candele Berkefeld superiore alla metà del rendimento iniziale.

Un inconveniente lamentato per le candele Chamberland e più ancora per quelle Berkefeld (vedi Kirchner, de Haan e Straub, Jolin, ecc.), è che esse, con le frequenti ripuliture e bolliture, si consumano molto, cosicchè dopo un certo tempo devono essere messe fuori uso, perchè sono divenute permeabili ai germi; questo inconveniente è tanto più grave per le candele Berkefeld, in quanto che queste costano di più. Con le candele Mallié invece ho potuto constatare che il consumo è minimo, quasi nullo, cosicchè si possono adoperare per moltissimo tempo, a meno che non si rompano o screpolino in qualche punto, il che non accade mai se la candela è sempre maneggiata con cura.

Introdotta e fissata nel manicotto metallico una candela sterilizzata, attorno all'estremità inferiore del manicotto stesso avvolgevo un pezzo di carta da filtro sterilizzata, allo scopo di proteggere contro ogni inquinamento da parte dei germi dell'aria l'apertura del beccuccio e l'acqua da essa sgocciolante. Poi toglievo dal beccuccio della candela il cappuccetto di cotone, aprivo il rubinetto dell'acqua e lasciavo cadere l'acqua filtrata in un recipiente qualsiasi.

Nella prima serie di esperienze, invece di mettere attorno al beccuccio della candela un cappuccetto di cotone, fissavo attorno ad esso con del cotone un corto e largo tubo di vetro, chiuso alla sua estremità inferiore con un batuffolo di cotone; sterilizzavo nella stufa a secco la candela così preparata, la introducevo e la fissavo nella sua custodia metallica, poi toglievo il batuffolo di cotone e aprivo il rubinetto dell'acqua. Nella seconda serie di esperienze, essendomi servito del filtro montato in laboratorio e dal quale l'acqua filtrata veniva raccolta in un apposito bariletto sottostante, non ho potuto conservare la disposizione precedente e ho perciò sostituito al tubo di vetro avvolgente il beccuccio della candela una specie di tubo a imbuto di carta da filtro, avvolgente tutto l'apparecchio come ho detto sopra. Avendo constatato che con questo dispositivo l'acqua filtrata era ugualmente al riparo da qualsiasi inquinamento da parte dei germi dell'aria, ed essendo questo dispositivo molto più comodo, l'ho conservato in tutte le altre serie di esperienze.

***

Per prelevare campioni di acqua filtrata allo scopo di farne l'analisi batteriologica, sollevavo un po' il tubo di carta da filtro e lasciavo cadere dentro a delle capsule di Petri sterilizzate un certo numero di goccie. Già prima avevo determinato per ciascun filtro il numero di goccie occorrenti per fare 1 cmc., e avevo trovato che ne occorrevano da 12 a 12 $^1/_2$.

Generalmente i primi giorni lasciavo cadere 24 goccie, cioè 2 cmc.; poi, quando avevo motivo di supporre che stesse per cominciare il passaggio dei germi, solo 12 goccie, cioè 1 cmc., e poi, via via che constatavo l'aumento dei germi nell'acqua filtrata un numero sempre minore di goccie fino ad una sola. Alcune volte anzi, quando prolungavo per molti giorni l'esperienza con un filtro, o quando la temperatura dell'acqua filtrante era molto elevata, per poter procedere alla conta delle colonie, essendo i germi numerosissimi nell'acqua filtrata, dovevo diluire questa in acqua sterile; generalmente allora seminavo in una capsula di Petri $^1/_{120}$ di cmc. dell'acqua filtrata. Per ottenere $^1/_{120}$ di cmc., non avevo da far altro che lasciar cadere una goccia di acqua filtrata ($^1/_{12}$ di cmc.) in una provetta contenente 10 cmc. di acqua sterilizzata, agitare fortemente e a lungo la provetta stessa e prelevare 1 cmc. di quest'acqua con una pipetta sterilizzata.

Variando il numero di goccie dell'acqua filtrata, o la quantità d'acqua sterile impiegata per la diluzione, o la quantità di acqua diluita che prelevavo, potevo ottenere qualsiasi frazione di cmc. dell'acqua filtrata. Siccome poi non era possibile stabilire *a priori*, sia pure con approssimazione, il numero di germi presenti in 1 cmc. dell'acqua filtrata, così per evitare l'inconveniente di non potere procedere al conteggio delle colonie per il loro numero troppo grande o per la presenza di colonie rapidamente ed estesamente fluidificanti la gelatina, per ogni esame batteriologico dell'acqua filtrata facevo sempre o quasi sempre due colture piane in gelatina, adoperando frazioni diverse dell'acqua filtrata; ciò non ostante in qualche rarissimo caso non mi fu possibile in nessuna delle due capsule procedere ad un conteggio esatto delle colonie. In alcuni esami poi, nella

esperienza della tabella 10ª, non potei stabilire il numero di germi contenuto in 1 cmc. di acqua filtrata per avere troppo fortemente diluito la goccia caduta dal filtro, tanto che ne ebbi delle capsule sterili o quasi.

Messa nella capsula di Petri la quantità voluta di acqua filtrata, versavo subito nella capsula stessa una provetta di gelatina.

Nella prima serie di esperienze ho voluto istituire dei confronti fra l'agar e la gelatina, adoperando come agar tanto il comune agar nutritivo quanto l'agar all'albumose di Heyden, e così pure per la gelatina usando tanto la comune gelatina nutritiva quanto la gelatina preparata secondo il metodo di Abba e da lui proposta per l'esame batteriologico delle acque potabili (1). Siccome contemporaneamente alla presa e all'analisi batteriologica di campioni d'acqua filtrata, procedevo anche alla presa e all'esame di campioni dell'acqua della conduttura (e dell'acqua rinchiusa nel manicotto metallico e circostante alla candela) per vedere quale fosse la flora batterica dell'acqua sottoposta alla filtrazione, così anche per l'analisi batteriologica di quest'acqua (acqua del Gorzente) ho voluto istituire dei confronti fra i 4 terreni culturali sopra enumerati e ho potuto constatare che il maggior numero di colonie si sviluppa sull'agar all'albumose, poi sulla gelatina Abba e sull'agar comune, poi sulla gelatina comune. Naturalmente tutte le capsule erano mantenute alla stessa temperatura di circa 20°-22° C. e il conteggio delle colonie si faceva in tutte dopo lo stesso numero di giorni di incubazione. Ecco p. es. il numero di colonie, riferito a 1 cmc. d'acqua, di un campione preso due giorni dopo una forte pioggia; il conteggio è stato fatto dopo 8 giorni di incubazione a 20°-22° C.: in gelatina comune 250, in gelatina Abba 900, in agar comune 1000, in agar all'albumose quasi 3000 (2).

---

(1) La composizione della gelatina Abba è la seguente: acqua distillata gr. 1000; estratto di carne Liebig gr. 6; gelatina gr. 150. Si tiene per ½ ora a 100°, poi si aggiunge tanto di soluzione satura di soda, che una goccia di gelatina, mischiata su fondo bianco con una goccia di una soluzione alcoolica al 3 % di fenolftaleina, si colori debolmente rosa; infine si aggiunge ½ grammo di soda per ogni litro di gelatina, poi si tiene a 100° per ¼ d'ora e si filtra (*Ueber die Nothwendigkeit, die Technik der bakteriolog. Wasseruntersuchung gleichfoermiger zu gestalten*. Zeitschrift für Hygiene, vol. 33, pag. 372.

(2) Dirò qui che avendo avuto occasione di fare delle analisi batteriologiche di campioni di acqua marina presi fuori del porto di Genova (Bollettino della Regia accademia medica di Genova, 1905) e avendo sperimentato per l'analisi batteriologica di questi campioni i 4 terreni culturali suddetti, ho trovato che quelli in cui si sviluppavano il maggior numero di colonie erano la gelatina Abba e l'agar all'albumose (da 600 a 700 colonie per 1 cmc. di acqua, mentre in agar comune e in gelatina comune se ne contavano solo da 250 a 350). Benchè dunque tanto per l'acqua del Gorzente quanto per quella marina da me esaminata, l'agar all'albumose si sia mostrato il terreno culturale più favorevole allo sviluppo del maggior numero dei batteri in esse contenuti (per l'acqua marina però non nello stesso grado che per l'acqua del Gorzente), pure il risultato diverso ottenuto per queste due acque rispetto agli altri tre terreni culturali mi induce a ritenere che non si possa affermare la maggiore o minore bontà di un dato terreno culturale per l'esame batteriologico delle acque in genere, ma solo per quello di una data acqua, e ciò in rapporto alla flora batterica di quest'acqua. Così forse si spiega la diversità di risultati che hanno ottenuto quelli che si sono occupati di questo argomento.

Quanto ai campioni di acqua filtrata, siccome la specie batterica che nelle esperienze di questa prima serie passava per la prima traverso al filtro era, come vedremo in seguito, un vibrione fondente rapidamente ed estesamente la gelatina e siccome in breve tempo questo vibrione si trovava nell'acqua filtrata in grande quantità, nelle capsule in gelatina comune e in gelatina Abba si verificava l'inconveniente della rapida fluidificazione della gelatina stessa, cosicchè bisognava eseguire il conteggio dopo due o tre giorni soltanto di incubazione; invece nelle capsule in agar la conta si poteva fare anche dopo molti giorni, specialmente in quelle di agar all'albumose in cui le colonie restavano più piccole e più distinte l'una dall'altra; facendo il conteggio dopo due giorni in tutte le capsule, si trovava in tutte presso a poco lo stesso numero di queste colonie (1). Tenendo quindi conto di questo risultato, sarebbe stato preferibile per l'esame batteriologico dell'acqua filtrata adoperare come terreno culturale l'agar (sia quello comune che quello all'albumose), che permetteva di protrarre per un maggior numero di giorni il conteggio delle colonie e di ottenere quindi dei numeri più vicini al vero. Però, siccome prolungandosi la filtrazione, nell'acqua filtrata passavano altre due specie di vibrioni (tab. 4ª, n. 9-13), di cui uno sprovvisto della proprietà di fluidificare la gelatina, ho trovato più conveniente in seguito limitarmi all'uso della gelatina, la quale mi permetteva di distinguere subito le colonie del vibrione liquefacente da quelle dell'altro non liquefacente e di calcolare quindi il numero dei germi, appartenenti all'una o all'altra specie, passati nell'acqua filtrata; di più, anche le colonie della terza specie di vibrione, contraddistinte dalla presenza di un pigmento giallo-aranciato, si diagnosticavano più facilmente nelle piastre di gelatina che in quelle in agar, giacchè quivi le colonie erano poco o nulla colorate. Inoltre proseguendo ancora più a lungo la filtrazione, constatai che insieme con i tre vibrioni passavano batteri di altre specie (tab. 4ª, n. 14-17), per il riconoscimento delle quali meglio si prestavano, come generalmente accade, le colture in gelatina che quelle in agar. *Per tutti questi motivi*, in tutte le altre serie di esperienze, *per determinare il numero di germi contenuto in* 1 *cmc. dell'acqua filtrata, ho fatto le colture a piatto soltanto in gelatina, adoperando la comune gelatina nutritiva;* anche per le esperienze della 1ª serie, i numeri riportati nelle prime 3 tabelle relativi al contenuto batterico dell'acqua filtrata sono quelli dedotti dalla conta delle colonie nelle capsule di gelatina. Anche per l'acqua dell'Acquedotto Civico (tabelle 6ª e 7ª), come pure per quella del Gorzente quando in essa non ritrovai più nessuna delle tre specie di vibrioni sopra accennate (tab. 5ª), vidi che le colture a piatto in gelatina erano quelle che meglio si prestavano per il riconoscimento delle diverse colonie. *Solo nelle ultime esperienze relative alla ricerca dei germi patogeni eventualmente passati nell'acqua filtrata* (tab. 8ª, 9ª e 10ª), *accanto alle colture piane in gelatina ne ho fatte altre in agar, per le ragioni che esporrò più avanti;* anche qui

(1) Ciò non toglie naturalmente la possibilità, che facendo delle esperienze con delle altre acque potabili, all'esame batteriologico dell'acqua filtrata fatto con colture piane coi diversi terreni nutritivi sopra enumerati si trovino dei risultati diversi.

però il quantitativo batterico è stato ricavato dalle capsule di gelatina (1).

***

I risultati da me ottenuti sono esposti nelle tabelle raccolte alla fine di questo lavoro.

Dall'esame di queste tabelle risulta l'esattezza delle prime cinque proposizioni, che ho enunciato in principio del mio lavoro (v. pag. 624) e che, constatate già per i filtri Chamberland e Berkefeld, si possono ripetere per i filtri Mallié. *Il tempo per il quale questi filtri sono capaci di trattenere tutti i germi che si trovano nell'acqua da filtrare, varia a seconda del filtro, della temperatura alla quale ha luogo la filtrazione, della qualità dell'acqua filtrante e della circostanza se la filtrazione è continua o interrotta.*

***

L'influenza più grande è certamente esercitata dalla temperatura.

Nelle tabelle io ho riportato soltanto la temperatura dell'acqua filtrante, senza preoccuparmi di quella dell'acqua nella condottura, giacchè è soltanto la temperatura dell'acqua che si trova nel filtro

---

(1) Non tutti gli autori, delle cui esperienze ho fatto un cenno nel riassunto bibliografico, hanno indicato nei loro lavori se per procedere alla determinazione del numero dei germi contenuti in 1 cmc. dell'acqua filtrata, hanno fatto delle colture piane in gelatina o in agar; alcuni di quelli poi che dicono di aver fatto colture in agar, non aggiungono a quale temperatura hanno tenuto le capsule; eppure quest'ultimo dato è, come vedremo, importantissimo, perchè alcuni batteri acquatili non si sviluppano a 37° C. Altri autori poi non si sono preoccupati di determinare il quantitativo batterico dell'acqua filtrata, ma semplicemente di constatare se questa era sterile o no, e per far ciò hanno aggiunta l'acqua filtrata a del brodo contenuto in provette o in palloni (Miquel, Freudenreich, ecc.). Questo procedimento però non mi sembra da consigliarsi, perchè se per caso durante l'aggiunta del campione d'acqua un germe dell'aria cade nella provetta o nel pallone, si corre il rischio, per l'intorbidamento del brodo che si verifica, di dichiarare non sterile un'acqua sterile.

Un punto importante per poter fare il confronto dei risultati ottenuti nei giorni successivi di una determinata esperienza è il numero di giorni per il quale le colture sono state esposte alla temperatura di sviluppo: non è solo necessario che sia sempre la stessa la temperatura, occorre anche che sia costante la durata di esposizione a tale temperatura: io generalmente ho proceduto al conteggio delle colonie dopo 3 giorni di esposizione a 22° C.; qualche volta però la temperatura è salita fino a 24°, qualche volta è scesa fino a 20°; talvolta ho contato le colonie dopo 4 giorni, tal'altra dopo 2 giorni e perfino dopo 1 giorno soltanto (tab. 8ª) a causa del rapido sviluppo di alcune colonie fluidificanti; così si spiegano alcune irregolarità che si ebbero nel numero dei germi e che sono state riportate fedelmente nelle tabelle.

quella che influisce sulla rapidità di sviluppo e di moltiplicazione dei germi acquatili invadenti lo spessore della parete filtrante e quindi sulla rapidità del loro passaggio traverso al filtro. La temperatura da me segnata nelle tabelle è quella misurata direttamente al momento della presa del campione. Seguendo queste temperature si può constatare che esse non variano molto nel corso della giornata; la mattina presto la temperatura è un po' più bassa, perchè l'acqua che arriva nel filtro è quella che si è raffreddata durante la notte, poi, siccome nel corso della giornata l'acqua raccolta in serbatoi esposti al sole si va mano a mano riscaldando, anche la temperatura dell'acqua filtrante si innalza, ma di poco, perchè anche quella che filtrava alla mattina presto, siccome la filtrazione aveva luogo in un ambiente chiuso (e d'inverno anzi riscaldato), si riscaldava nel filtro. Insomma se la filtrazione ha luogo in un ambiente in cui le variazioni della temperatura esterna si risentono poco o nulla e se la filtrazione non è rapida, la temperatura dell'acqua filtrante si mantiene quasi costante; ciò è accaduto per le esperienze riferite dalla tabella 1ª alla 5ª. Nelle tabelle 6ª e 7ª, invece della temperatura dell'acqua filtrante misurata al momento della presa del campione, ho riportato la temperatura massima e minima della giornata e ciò perchè la filtrazione in questo caso aveva luogo all'aperto, in un cortile e quindi la temperatura dell'acqua seguiva le variazioni della temperatura ambiente, tanto più che in queste esperienze la filtrazione era lentissima. Infine, per quel che riguarda le tabelle 8ª, 9ª e 10ª, siccome qui la filtrazione aveva luogo nella stanza dei termostati e siccome inoltre la filtrazione era estremamente lenta e l'acqua che arrivava al filtro proveniva da un bottiglione collocato anch'esso nella stanza dei termostati, per tutta la durata dell'esperienza la temperatura dell'acqua filtrante si manteneva costante.

Confrontando la tabella 4ª con la 5ª e con la 8ª (acqua del Gorzente) e la 6ª con la 7ª e con la 9ª (acqua dell'Acquedotto Civico), si vede che i germi cominciano a comparire tanto più presto quanto più alta è la temperatura. Nella filtrazione dell'acqua del Gorzente, con una temperatura variabile da 14°.5 a 16°.5 (tabella 4ª, dal n. 1 al 7), i germi cominciano a comparire nell'acqua filtrata già dopo 7 giorni; con una temperatura variabile da 11° a 13°, e quindi inferiore, nella media, di tre gradi circa soltanto (tab. 5ª, dal n. 1 al n. 11), i germi non passano che dopo 10 giorni; con una temperatura costante di 28° circa (tab. 8ª), i germi si trovano nell'acqua filtrata già dopo due giorni. Nella filtrazione dell'acqua dell'Acquedotto Civico, con una temperatura variabile da 7°.2 a 13°.6 (tab. 6ª, dal n. 1 al n. 9), i

primi germi appaiono nell'acqua filtrata dopo 7 giorni; con una temperatara variabile da 9°.4 a 16°.5 e quindi di poco superiore (tab. 7ª, dal n. 1 al n. 6), dopo 5 giorni; con una temperatura costante di 30° C. (tab. 9ª) dopo due o tre giorni (1).

Dall'esame delle tabelle si vede inoltre che quanto più alta è la temperatura di filtrazione, non solo tanto più presto i germi cominciano a passare nell'acqua filtrata, ma anche tanto più rapidamente va crescendo il loro numero; così, per esempio, mentre nella esperienza della tab. 8ª (temperatura costante 28° C.), già dopo 11 giorni in 1 cmc. di acqua filtrata si contano 648,000 batteri, in quella della tab. 4ª (temperatura media 15°C.), dopo 28 giorni di filtrazione continua se ne riscontrano solo 18,600. A proposito dei risultati riportati in queste e nelle altre tabelle, ricordo un fatto, cui ho già accennato più sopra, che cioè l'aumento del numero dei germi contenuti nell'acqua filtrata non si effettua regolarmente di giorno in giorno, anzi neppure costantemente, o almeno tale non risulta dagli esami istituiti sopra le piccole quantità di acqua prelevata. In tutte le tabelle infatti, nelle quali sono riferiti i risultati di esperienze prolungate per un certo numero di giorni dopo la prima comparsa di germi nell'acqua filtrata (vedi tabelle 3ª, 4ª, 8ª, 9ª e 10ª), si vede che ci sono qua e là dei giorni in cui il quantitativo batterico trovato è stato inferiore a quello trovato nel giorno precedente. Per comodità di osservazione ho sottolineato nelle tabelle stesse questi risultati apparentemente contrad-

---

(1) Quando si dice che i batteri contenuti in un'acqua sottoposta alla filtrazione passano traverso al filtro tanto più presto (e tanto più copiosamente), quanto più alta è la temperatura di filtrazione, s'intende sempre naturalmente che questa temperatura resti nei limiti favorevoli allo sviluppo dei comuni batteri acquatili e perciò che i germi passano tanto più presto quanto più la temperatura di filtrazione si avvicina alla temperatura *optimum* di sviluppo dei germi stessi. E siccome quest'*optimum* di temperatura non è lo stesso per tutti i batteri acquatili, si capisce come non si possa stabilire per tutte le acque in genere quali siano i limiti di temperatura nei quali il passaggio dei germi traverso a un dato filtro avvenga il più rapidamente possibile; questi limiti anzi non si possono stabilire neppure per una determinata acqua, giacchè molte acque presentano nel corso dell'anno delle variazioni rilevanti nella loro flora batterica, e così mentre un germe presente in un'acqua ad una data epoca ha il suo *optimum* di sviluppo, per esempio, a 20°, altri batteri presenti in altre epoche possono averlo a 25°, a 30°, a 35°. Si capisce anche come con determinate acque, ad una data epoca almeno, se la filtrazione ha luogo ad una temperatura molto elevata, per esempio 35°, si possa ottenere costantemente acqua sterile, se nell'acqua stessa non ci sono germi capaci di svilupparsi a quella temperatura. E che ciò possa accadere, lo vedremo in seguito. Per ora mi limito a far osservare che tali considerazioni non hanno una grande importanza pratica, perchè, nelle nostre contrade almeno, non accade mai o quasi mai di dover filtrare, per poi berla, un'acqua a temperature così elevate.

dittori e che si spiegano o per la diversa durata di esposizione delle colture alla temperatura di sviluppo, o per la diversa temperatura alla quale sono state esposte o perchè nelle diluizioni non sempre si riesce a distribuire uniformemente i germi nella massa di acqua sterile adoperata per la diluizione, o infine perchè una data goccia di acqua filtrata caduta in un determinato momento dal beccuccio della candela può avere trascinato con sè un numero maggiore o minore di germi aderenti alla superficie interna della parete filtrante o può provenire da un punto della parete filtrante in cui i germi sono più abbondanti, ecc., ecc. I risultati esposti nella tabella vanno quindi esaminati a grandi linee, sorvolando sui particolari, ed è appunto da questo esame fatto con tali criteri che risulta la legge del progressivo aumento dei germi nell'acqua filtrata, legge che non è distrutta dalle eccezioni.

Dallo studio fatto con tali criteri, specialmente nelle tabelle 3ª e 4ª, si vede pure come, mentre nei primi giorni di passaggio di germi nell'acqua filtrata, in questa i germi vanno di giorno in giorno crescendo rapidamente, nei giorni successivi, pur essendo più grande in cifre assolute l'aumento dei germi, il loro aumento, considerato in rapporto al numero dei germi del giorno precedente, è minore e diventa di giorno in giorno sempre più piccolo e anzi, dopo un certo numero di giorni, anche l'aumento in cifre assolute va diminuendo e pare che a un certo momento non si verifichi più e che anzi il numero dei germi contenuti in 1 cmc. di acqua filtrata, raggiunto un limite massimo, vada diminuendo.

L'asserzione di quest'ultimo fatto non è tanto recisa, perchè appunto negli ultimi giorni di osservazione ci sono state, nel quantitativo batterico dell'acqua filtrata, delle oscillazioni e l'esperienza non è stata proseguita più oltre; lo stesso vale per le tabelle 8ª e 9ª. Invece dall'esame della tabella 10ª il fatto enunciato più sopra risulta in modo evidentissimo. In questa esperienza, nei primi 17 giorni (dal n. 2 al n. 7) gli esami dell'acqua filtrata sono stati fatti ad intervallo di qualche giorno l'uno dall'altro e quindi da un risultato all'altro si hanno degli aumenti fortissimi; un aumento pure forte si ha al n. 8, poi il quantitativo batterico va, bruscamente dapprima, più lentamente in seguito, diminuendo fino a diventare molto più piccolo del massimo raggiunto (al n. 19, per esempio, esso è 1/65 circa di quello del n. 8).

Quanto alla interpretazione di questo fatto, mi pare che si possano fare due supposizioni: o che si tratti di un ostacolo meccanico al passaggio dei germi o che questi non possano più moltiplicarsi rigogliosamente. L'ostacolo al passaggio dei germi sarebbe costituito sia

dalla patina di limo finissimo depositatosi sulla superficie esterna della candela filtrante e in parte anche nello spessore della sua parete, sia dai corpi stessi batterici, vivi e morti, che devono avere invaso e ostruito i pori-canali della parete filtrante. La difficoltà di moltiplicazione rigogliosa dei germi deve dipendere dal fatto che, siccome la filtrazione è diventata estremamente lenta, il materiale nutritizio trasportato dall'acqua è scarsissimo e viene così esaurito presto dai germi che si trovano nell'acqua circostante alla candela. E che in questa abbia realmente luogo una moltiplicazione di germi risulta dalla tabella 11ª e da quello che dirò in seguito (v. pag. 649).

***

Che anche la qualità di un'acqua possa influire sulla rapidità e sulla quantità con la quale i germi passano nell'acqua filtrata, risulta dal confronto delle tabelle 4ª e 5ª con la 6ª e 7ª. Ricorderò che « qualità di un'acqua » va qui intesa non soltanto nel senso della sua composizione chimica, ma anche, e anzi ancora di più, nel senso del suo contenuto batterico, e che l'influenza del contenuto batterico dipende non tanto dal quantitativo batterico, cioè dal numero di germi contenuti in 1 cmc. dell'acqua, quanto dalla flora batterica, cioè dalle specie di germi presenti nell'acqua. Già ho detto (v. pag. 634) perchè la qualità di un'acqua, intesa in questo senso, può influire sulla rapidità di passaggio dei germi traverso a un filtro e come forse a questa causa debba in parte ascriversi la diversità dei risultati ottenuti dai diversi sperimentatori.

Nel nostro caso vediamo che, a parità di condizioni di temperatura, nelle esperienze con l'acqua dell'Acquedotto Civico riferite alle tabelle 6ª (temperatura media nei giorni precedenti il passaggio dei germi: 11° circa) e 7ª (temperatura media: 13° circa), i germi han cominciato a comparire nell' acqua filtrata molto prima che nell'esperienza con l'acqua del Gorzente riferita nella tabella 5ª (temperatura media: 12° circa); essi infatti non soltanto sono comparsi cinque giorni prima, quando la temperatura fu leggerissimamente più elevata (tab. 7ª), ma anche tre giorni prima, quando la temperatura fu un po' più bassa (tab. 6ª).

Molto istruttivo a questo riguardo è il confronto fra le tabelle 8ª, 9ª e 10ª, relative alla filtrazione dell'acqua dei tre acquedotti: De Ferrari-Galliera, Civico e Nicolay, fatta presso a poco alla stessa temperatura e alla stessa pressione e quindi in circostanze uguali; nella tabella 8ª vediamo che il quantitativo batterico dell'acqua filtrata è

altissimo, superiore cioè al mezzo milione, già dopo 9 giorni di filtrazione (vedi n. 10), nella tabella 10ª dopo 18 giorni (vedi n. 8), nella tabella 9ª si avvicina al mezzo milione solo dopo 28 giorni (vedi n. 25).

Non bisogna però spingere troppo oltre il valore delle conchiusioni che si potrebbero dedurre da questi confronti, perchè *la rapidità con la quale i germi delle acque potabili filtranti passano nell'acqua filtrata, può variare*, come vedremo meglio più innanzi (v. pag. 650), non soltanto a seconda della qualità dell'acqua potabile in esame, ma anche, *per una stessa acqua potabile, a seconda dell'epoca nella quale hanno luogo le esperienze di filtrazione.*

Siccome infatti la diversa rapidità, con la quale, a parità di condizioni di temperatura, di filtro, ecc., possono passare nell'acqua filtrata i germi di due acque potabili diverse, dipende principalmente dalla diversa flora batterica di queste due acque, siccome inoltre la flora batterica di una data acqua può variare da epoca a epoca, si capisce come, se in un dato momento si trova nell'acqua da filtrare un germe capace di svilupparsi rapidissimamente nell'acqua a quella temperatura, se invece in un altro periodo questo germe non si trova più nell'acqua e gli altri germi in essa presenti non sono capaci, a quella stessa temperatura, di svilupparsi altrettanto rapidamente e rigogliosamente, in questo secondo caso l'acqua filtrata si manterrà sterile più a lungo che nel primo caso. Dall'osservazione comparata della tabella 4ª (acqua del Gorzente, nel novembre del 1904) con la tabella 5ª (la stessa acqua, nel marzo 1905), non si può veramente dedurre nessuna conclusione rigorosa, perchè il titardo di tre giorni nell'esperienza della tabella 5ª dipende, se non esclusivamente, certo principalmente dalla circostanza della temperatura più bassa; siccome però la differenza di temperatura fu soltanto, nella media, di tre gradi circa, forse sul ritardo nel passaggio dei germi influì anche il fatto dell'assenza, nell'acqua da filtrare, di tutte e tre quelle specie di vibrioni che per prime passarono, come più diffusamente vedremo in seguito, nella esperienza della tabella 4ª.

***

Che infine anche la circostanza della filtrazione continua od interrotta influisca sui risultati della filtrazione, si può dedurre dall'esame delle prime tre tabelle confrontate con le due successive. Nelle prime tre esperienze la filtrazione è stata sempre interrotta per mancanza d'acqua; nella prima e nella seconda esperienza, dopo una giornata di filtrazione, ne sono succedute due di interruzione e al primo esame batteriologico dell'acqua filtrata fatto dopo aver riattivato il funziona-

mento del filtro, cioè al 3° o al 4° giorno, si sono riscontrati dei germi. Nella terza esperienza l'interruzione ha avuto luogo al 5° giorno di filtrazione ed è durata solo qualche ora; nell'esame del campione, prelevato due o tre ore dopo riattivata la filtrazione, si sono trovati dei batteri. In questo caso però c'è da ritenere che i germi si sarebbero riscontrati ugualmente, indipendentemente dalla interruzione, e ciò sia perchè questa è durata solo poche ore, sia perchè le colonie sviluppatesi nelle colture a piastre in gelatina (comune e di Abba) e in agar (comune e all'albumose) appartenevano tutte alla stessa specie, sia infine perchè, data la temperatura piuttosto elevata (18° in media, nei giorni precedenti il passaggio dei germi), c'era appunto da attendersi verso quel giorno la presenza di batteri nell'acqua filtrata (confronta la tabella 3ª con la 4ª, nella quale si vede che la temperatura, nei giorni precedenti il passaggio dei germi, fu in media 15°, cioè di 3° circa più bassa che nella precedente esperienza, e i germi comparvero nell'acqua filtrata due giorni più tardi). Nelle prime due esperienze invece l'interruzione, prolungata per due intiere giornate, deve avere influito sulla comparsa di germi nell'acqua filtrata raccolta per l'analisi batteriologica, e ciò lo deduco non soltanto dalla rapidità di questa comparsa, che si potrebbe fino a un certo punto spiegare con la maggiore temperatura, ma anche dal fatto che le colonie sviluppatesi nelle piastre di agar e di gelatina appartenevano a tre diverse specie almeno, mentre invece in tutte le altre esperienze i germi che passavano nei primi giorni appartenevano tutti alla stessa specie. Questo fatto fa supporre che ci sia stato un inquinamento dell'acqua filtrata, dovuto appunto alla interruzione della filtrazione, tanto più che nei giorni successivi le colonie, pur essendo più numerose, appartenevano tutte ad una sola specie.

***

Questo criterio della unicità della specie cui appartengono le colonie sviluppatesi in una piastra di agar o di gelatina in cui si sia seminata dell'acqua filtrata, unito con l'altro criterio del numero delle colonie stesse, è importantissimo per stabilire il momento in cui si può affermare che i germi hanno cominciato a passare nell'acqua filtrata. In quasi tutte le tabelle contenenti i risultati di alcune delle esperienze da me eseguite, si vede che nelle prime giornate di filtrazione, intercalati con gli esami di acqua filtrata che non hanno dato nelle piastre di gelatina lo sviluppo di nessuna colonia, ci sono alcuni esami che hanno dato lo sviluppo di una, due e perfino tre colonie (vedi tabelle

3ª, 4ª, 5ª, 6ª). La presenza di queste colonie non può attribuirsi ad altro che ad un accidentale inquinamento della capsula in cui si è seminato il campione d'acqua; nulla di più facile che, o durante il tempo in cui si è tenuta leggermente scoperchiata la capsula per farvi cadere le goccie di acqua filtrata (tempo tanto più lungo quanto più grande è il numero di goccie che si raccoglie o quanto più lenta è la filtrazione), o anche nell'atto di versare nelle capsule stesse la gelatina, qualche germe dell'aria possa cadere nella capsula e sviluppandosi dare poi luogo a una colonia.

A me ciò è accaduto 7 volte su 32; di queste 7 volte, 4 volte ho trovato nella capsula una sola colonia, 2 volte due colonie e 1 volta tre colonie; in questi ultimi 3 casi, le colonie appartenevano a specie diverse. Di più, la maggior parte delle volte si trattava di una muffa, il *Penicillium glaucum*, le cui spore sono diffusissime nell'aria, mentre non si può supporre che esse siano passate traverso al filtro. Infine questi casi si sono ripetuti più di frequente (4 su 7) e in più grave misura (2 e perfino 3 germi per volta) quando tale inquinamento era più facile e cioè nella esperienza riferita alla tabella 6ª, esperienza che è stata fatta all'aperto, in un cortiletto in cui il vento soffiava talvolta molto fortemente e poteva quindi trasportare con tutta facilità nella capsula qualche germe dell'aria, tanto più che, essendo la filtrazione molto lenta fino dal principio dell'esperienza (e ciò perchè la pressione era molto bassa), per raccogliere 24 goccie di acqua filtrata occorreva relativamente molto tempo, cioè da 15 a 20 secondi (1). Nella successiva esperienza, fatta con la stessa acqua ma al riparo dal vento dentro un casotto, questo inquinamento non si verificò mai.

Del resto la moltiplicità delle cause di inquinamento e quindi la facilità con la quale questo può avvenire sono già state messe in rilievo da alcuni degli autori da me consultati, per esempio, dal Gruber, da Jolin e dall'Abba; questi anzi dice che non si deve parlare di germi realmente presenti nell'acqua filtrata, cioè passati traverso al filtro, quando non si contano più di 5 colonie per capsula. A me veramente, quando l'acqua era sterile, non è occorso mai di trovare nelle capsule 5 colonie, ma tutt'al più, e solo una volta in condizioni favorevolissime di inquinamento, 3. Sono anch'io d'accordo con quanto dice

(1) Se il rendimento era di 360 cmc. all'ora (n. 8 della tabella 6ª), vuol dire che era di 6 cmc., cioè di 72 goccie, al minuto; perchè sgocciolassero 24 goccie, occorreva quindi un terzo di minuto primo, cioè 20 secondi; se il rendimento era di 480 cmc. all'ora (n. 3), cioè di 96 goccie al minuto, per raccogliere 24 goccie occorrevano 15 secondi.

l'Abba, ma mi pare si debba aggiungere che bisogna tener conto anche della unicità o della varietà delle colonie sviluppate e del fatto se nei giorni successivi quelle stesse colonie si ritrovano, e in aumento. Se questo caso si verificasse, mi pare che si potrebbe affermare che il passaggio dei germi traverso al filtro è cominciato proprio allora, quando è stato prelevato il campione che ha dato luogo allo sviluppo di quelle 3, 4 o 5 colonie.

***

Quando si tratta di germi realmente contenuti nell'acqua filtrata, vediamo che essi compaiono subito in numero più o meno rilevante e che il loro numero va gradatamente aumentando nei giorni successivi, e che, generalmente almeno, essi appartengono dapprima tutti ad una sola specie, poi a 2, a 3, 4, 5 e perfino a 6 (tabella 4ª) *specie diverse;* questo è il numero massimo da me trovato e l'ho riscontrato una volta sola, in cui ho prolungato le ricerche per quasi un mese. L'Abba che ha proseguito le sue esperienze per un periodo di tempo molto più lungo, e a temperature svariatissime, ma tutte nei limiti delle condizioni ordinarie di filtrazione, avrebbe invece trovato che i germi che passano nell'acqua filtrata appartengono tutti e sempre a una o due specie soltanto. Queste differenze non si possono spiegare in altro modo che con la diversità della flora batterica delle acque prese in esame. Nell'acqua di Torino esaminata dall'Abba c'erano una o due specie batteriche capaci di una rapida e rigogliosa moltiplicazione nell'acqua e il loro abbondante sviluppo ha impedito quello delle altre specie. Ciò invece non è accaduto per tutte le specie dell'acqua del Gorzente di Genova, da me esaminata; una, due o tre specie hanno preso dapprima il sopravvento sulle altre, ritardando così il passaggio di queste nell'acqua filtrata, senza però impedirlo per sempre (1).

---

(1) Quanto all'acqua dell'Acquedotto Civico, non ho potuto verificare se i germi delle specie batteriche in essa contenuti fossero capaci di passare tutti o quasi tutti traverso al filtro, perchè le esperienze di filtrazione a temperature ordinarie non sono state con quest'acqua prosoguite per molti giorni dopo constatato il primo passaggio di germi. Vero è che nella esperienza della tabella 9ª la filtrazione si è prolungata per 30 giorni e che nell'acqua filtrata si sono riscontrate sempre due sole specie batteriche, ma siccome qui la temperatura dell'acqua filtrante era 30° C. e siccome anche l'acqua del Gorzente, che a 14°-16° C. lasciava passare fino 6 specie batteriche diverse (tabella 4ª), a 28° non ne lasciava passare che due sole (tabella 8ª), è lecito supporre che anche l'acqua dell'Acquedotto Civico a temperature più basse avrebbe forse lasciato passare un maggior numero di specie batteriche. Lo stesso può ripetersi per l'acqua dell' Acquedotto Nicolay, per la qnale fu fatta una sola esperienza a 27° (tabella 10ª).

Le specie che per le prime sono passate con l'acqua filtrata, nel caso dell'acqua del Gorzente, sono state diverse a seconda dell'epoca nella quale ho fatto l'esperienza. Nelle ricerche eseguite nei mesi di settembre, ottobre e novembre 1904 (tabelle 1ª, 2ª, 3ª e 4ª) sono state tre vibrioni acquatili, di cui uno, quello che generalmente passava per il primo, si distingue da quello del colera per il fatto che nei comuni terreni culturali si sviluppa meglio a 25° che a 37° e perchè non è agglutinato dal siero di sangue di conigli immunizzati contro il colera; gli altri due che passavano successivamente, si distinguono ancora più facilmente dal vibrione di Koch, l'uno perchè non fluidifica la gelatina e non si sviluppa a 37°, l'altro perchè produce un pigmento giallo-aranciato. Questi tre vibrioni acquatili sono stati da me minutamente descritti in un altro lavoro (1); qui dirò soltanto che nell'acqua del Gorzente, anche nel periodo in cui li ho ritrovati, in confronto con i batteri delle altre specie, essi erano relativamente scarsi e che non era quindi facile isolarli direttamente dall'acqua stessa. Molto più agevole invece riuscì il loro isolamento dall'acqua filtrata, giacchè in grazia del loro sviluppo più rapido e più rigoglioso essi passarono dapprima soli nell'acqua filtrata, dalla quale fu quindi facile ottenerli senz'altro in coltura pura. *In questo caso quindi la filtrazione costituì un mezzo di arricchimento di questi vibrioni acquatili nell'acqua che li conteneva e di isolamento dagli altri germi contenuti nella stessa acqua* (2).

Basta infatti confrontare i dati raccolti nelle prime due colonne della tabella 11ª con quelli delle due ultime colonne. Nei numeri 11 e 12, per esempio, mentre l'acqua della condottura conteneva per ogni cmc. da 350 a 600 germi appartenenti a 9 specie diverse, l'acqua filtrata conteneva da 4500 a 3500 germi, appartenenti a tre sole specie: i tre vibrioni sopra nominati.

Il numero delle specie diminuisce nell'acqua filtrata rispetto a quella da filtrare e cresce invece a dismisura il numero dei batteri; un aumento di questo numero e una piccola diminuzione del numero delle specie si ha già nell'acqua immediatamente circostante alla candela filtrante. In quest'acqua che si può considerare quasi stagnante, specialmente quando la filtrazione dura da molto tempo ed è perciò molto lenta, alcuni germi si sviluppano rigogliosamente (e quindi cresce il contenuto bat-

(1) *I vibrioni dell'acqua potabile di Genova.* Bollettino della R. Accademia medica di Genova, 1905.

(2) Ricorderò qui che già Cambier (1901, V) impiegò la filtrazione traverso a delle candele di porcellana, per separare i bacilli del tifo, i quali passavano più rapidamente traverso ad esse (vedi pag. 632), dai tifosimili, i quali passavano dopo.

terico) a danno di alcuni altri i quali finiscono per scomparire o quasi. Questo fatto risulta dal confronto delle colonne 3ª e 4ª con la 5ª e 6ª della tabella 11ª; il numero di specie batteriche dell'acqua del manicotto è più piccolo di quello dell'acqua della condottura; molto più grande, supe iore anche a quello dell'acqua filtrata stessa, è invece il numero dei germi.

Nelle esperienze eseguite con l'acqua del Gorzente nei mesi di marzo e aprile 1905 (tabella 5ª) non ho più ritrovato nell'acqua filtrata (e tanto meno in quella della condottura) i tre vibrioni acquatili isolati nelle precedenti ricerche. Si capisce del resto come la flora batterica dell'acqua del Gorzente, che è raccolta in due grandi laghi artificiali, sia soggetta a variazioni, e come alcune specie batteriche, che vi si trovano in determinati momenti, possano in altri periodi mancare del tutto o quasi.

La specie, che per prima passò nell'esperienza della tabella 5ª, fu un bacillo immobile, fluidificante la gelatina, corto e grosso, e che coi colori di anilina assumeva una colorazione bipolare più intensa, ricordante quella del bacillo della peste e dei pestimili; questo bacillo è quello stesso che avevo già riscontrato nell'acqua filtrata della tabella 4ª, a cominciare dal n. 17, cioè dopo 22 giorni di filtrazione continua; qui invece l'ho ritrovato nell'acqua filtrata già dopo 10 giorni, benchè la temperatura fosse più bassa. Ho pensato che ciò possa essere dipeso dal fatto che nelle precedenti esperienze il suo passaggio traverso alla parete filtrante fu ostacolato e ritardato dal rapido e rigoglioso sviluppo delle tre specie di vibrioni e questo conferma quello che dicevo precedentemente, che cioè lo sviluppo rapido e rigoglioso di alcune specie ritarda il passaggio delle altre, senza però impedirlo per sempre.

Queste osservazioni confermano pure quello che dicevo più sopra (a pag. 644), che cioè *la rapidità con la quale l'acqua filtrata cessa di essere sterile varia*, ceteris paribus, *con la flora batterica dell'acqua filtrante e quindi, per una stessa acqua potabile, può variare a seconda dell'epoca nella quale si compie la filtrazione.*

Quanto all'acqua dell'Acquedotto Civico, non ho mai potuto riscontrare in essa, all'esame diretto dei campioni prelevati dalla condottura, nessuna specie di vibrione e neppure nell'acqua filtrata ho visto comparire dei vibrioni (tabelle 6ª, 7ª e 9ª). I germi invece che per i primi passarono in quest'acqua filtrata, furono dei cocchi immobili, non fluidificanti la gelatina; poi seguirono dei bacilli corti e mobili, fluidificanti rapidamente la gelatina, producenti un pigmento verdastro e emananti un odore fetidissimo.

Anche nella filtrazione dell'acqua dell'Acquedotto Nicolay non ho

trovati i suddetti vibrioni, ma solo altre due specie batteriche (tabella 10ª).

La flora batterica dell'acqua filtrata dipende dunque essenzialmente dalla flora batterica dell'acqua da filtrare e quindi varia, sia col variare dell'acqua potabile, presa in esame, sia, per una stessa acqua potabile, col variare dell'epoca nella quale ha luogo la filtrazione. Vedremo inoltre in seguito (a pag. 664), come essa possa variare anche col variare della temperatura di filtrazione.

***

Solo su un fatto voglio qui richiamare l'attenzione e che mi sembra degno di nota, perchè in contrasto con quanto è stato affermato da alcuni autori, per esempio da Kübler (XXI), i quali hanno trovato che i primi batteri che passavano traverso ai filtri Chamberland o Berkefeld erano quelli mobili. Ciò può essere stato vero per le specie batteriche contenute nelle acque potabili con cui essi hanno fatto le loro esperienze sulla filtrazione, ma non è certo vero come legge generale di tutti i germi di tutte le acque potabili. Così, per esempio, mentre questo fatto si è verificato nelle prime esperienze sulla filtrazione dell'acqua del Gorzente (quelle delle tabelle 1ª, 2ª, 3ª e 4ª), in cui per le prime passarono le tre specie di vibrioni sopra accennate, tutte mobilissime e poi (tabella 4ª, n. 17) il bacillo a colorazione bipolare immobile, nella filtrazione della stessa acqua del Gorzente eseguita quattro mesi dopo (tabella 5ª) e in quella dell'acqua dell'Acquedotto Civico, fatta quasi contemporaneamente (tabelle 6ª e 7ª), è successo precisamente il contrario. Nell'esperienza riportata nella tabella 7ª, nei primi tre giorni di acqua filtrata non più sterile (numeri 6, 7 e 8), i germi contenuti nell'acqua filtrata erano tutti dei cocchi immobili, e solo al quarto giorno (n. 9) hanno cominciato a comparire i bacilli mobili. *Non si tratta dunque di mobilità o di immobilità dei batteri, quantunque non si possa negare che la mobilità possa favorire, dentro certi limiti, il passaggio di un germe traverso ai pori del filtro; ma se di due germi, uno mobile e l'altro immobile, quest'ultimo trova nell'acqua filtrante, a quella determinata temperatura, condizioni più favorevoli alla sua moltiplicazione che a quella del germe mobile, esso invaderà più rapidamente i pori del filtro e passerà prima nell'acqua filtrata.* Si capisce poi come sulla priorità del passaggio traverso al filtro possa avere un'influenza anche il rapporto numerico, secondo il quale questi due germi sono presenti nell'acqua da filtrare; il germe che è più abbondante potrà per questo stesso fatto trovarsi in condizioni migliori

dell'altro. Nel caso dell'esperienza della tabella 7ª, nell'acqua della condottura dell'Acquedotto Civico le due specie di batteri di cui ho parlato (cocco immobile e bacillo mobile) si trovavano presso a poco nella stessa quantità; la priorità del passaggio dei cocchi non può quindi essere dipesa da altro che dal loro sviluppo più rapido e più rigoglioso.

***

E neppure alla pressione dell'acqua filtrante deve ascriversi una grande influenza sulla rapidità del passaggio dei germi traverso alle pareti di un filtro. Certo non si può negare che essa, specialmente quando sia fortissima, possa favorire questo passaggio; ma l'influenza, ripeto, deve essere piccola e forse assolutamente trascurabile per piccole differenze di pressione. Ciò mi sembra risulti dal confronto della tabella 4ª con la 3ª e con la 6ª. Nella tabella 3ª riscontriamo la presenza di germi nell'acqua filtrata al quinto giorno, invece nella 4ª soltanto al settimo giorno, e ciò perchè più bassa fu la temperatura (da 14°.5 a 16°.5 invece che da 16° a 19°); se l'aumento della pressione avesse influito favorevolmente sulla rapidità del passaggio dei germi traverso al filtro, avrebbe dovuto compensare, almeno in parte, il ritardo dovuto all'abbassamento di temperatura e i germi avrebbero dovuto comparire nell'acqua filtrata presso a poco dopo lo stesso periodo di tempo; invece sono comparsi due giorni più tardi. Anche nella esperienza della tabella 7ª i germi compaiono nell'acqua filtrata al quinto giorno, cioè due giorni prima che nell'esperienza della tabella 4ª; ciò, come già si è visto, non perchè la temperatura fosse più elevata, chè anzi fu un po' più bassa (da 9°.4 a 16°.5 invece che da 14°.5 a 16°.5), ma per la diversa qualità dell'acqua adoperata; ciò non ostante la pressione era molto più bassa, e se la pressione avesse realmente una grande influenza sulla rapidità del passaggio dei germi, questi non si sarebbero dovuti riscontrare tanto tempo prima nella tabella 7ª, ma anzi prima nella 4ª che nella 7ª. Infine si vede che nelle esperienze delle tabelle 8ª, 9ª e 10ª, in cui la pressione era estremamente bassa ($^1/_1$, di atmosfera), e la filtrazione quindi lentissima, questa circostanza non impedì che i germi, sviluppatisi rapidamente in forza della temperatura elevata, passassero con l'acqua filtrata dopo due giorni e anche meno.

Tutte queste osservazioni non hanno veramente un grande valore, perchè per misurare l'importanza o meno della pressione sarebbe stato necessario sperimentare con la stessa acqua e nelle stesse condizioni di temperatura; se però dai confronti istituiti potesse farsi qualche

deduzione, si dovrebbe dire che non l'alta ma la bassa pressione favorisca il passaggio dei germi. E che ciò possa accadere in alcuni casi si capisce facilmente: *quando l'acqua che arriva nella condottura ha una temperatura bassa e l'ambiente (per esempio una cucina) ha una temperatura più alta, se la pressione è bassa, la filtrazione è lenta e l'acqua nel filtro ha maggior tempo di riscaldarsi e allora i germi traversano prima il filtro.*

In questi casi, però, non si può parlare di azione diretta della pressione, ma soltanto di una influenza indiretta.

***

Quanto alle variazioni del rendimento, poco ho da aggiungere a quello che già ho detto sopra e a quello che è stato già osservato dagli altri esperimentatori, sia per le candele filtranti in genere, sia per quelle Malliè in specie. Per queste ultime rimando alle esperienze di Main (1) e ai numeri riportati nelle mie tabelle, dalle

(1) Main (1901, XXVII) che filtrava traversò a una sola candela l'acqua della Senna alla pressione di $^1/_{10}$ di atmosfera, ottenne al principio della filtrazione cmc 1800, poi successivamente dopo 1, 2, 3.... 10 giorni, cmc. 840, 610, 720, 715, 480, 505, 450, 390, 465, 350. Il rendimento sarebbe quindi molto irregolare e l'A. attribuisce le irregolarità alle variazioni nella composizione dell'acqua, che non fu sempre ugualmente torbida. Siccome le particelle sospese nell'acqua e che la rendono torbida sono trattenute alla superficie del filtro, e in parte anche nello spessore di esso, non si capisce come per il solo fatto che l'acqua diventi meno torbida, il rendimento del filtro, che in un dato giorno (2°, 5°, 8°) era sceso a 610, 480, 390 cmc. all'ora, possa il giorno successivo (3°, 6°, 9°), salire rispettivamente a 720, 505, 465 cmc. all'ora; a me pare che un aumento così forte del rendimento non possa attribuirsi ad altro che ad un corrispondente aumento della pressione dell'acqua filtrante; e che così realmente sia accaduto, mi è confermato anche dal fatto che il giorno successivo (quando cioè deve essere venuto a mancare il transitorio aumento della pressione) il rendimento è rapidamente disceso al disotto di quello che era prima che subisse quell'aumento temporaneo; così mentre il 2° giorno il rendimento era di 610 e al 3° e 4° giorno di 720 e 715, al 5° giorno è sceso a 480 e risalito nel 6° giorno a 505 è disceso nel 7° giorno a 450; mentre il giorno 8° era a 390 e al 9° di 465, al 10° è sceso a 350. E non con altro che colle variazioni di pressione si può spiegare il fatto che il rendimento che nella 1ª ora era di 1800 cmc. e alla 10ª ora era ancora di 1800, dopo altre 14 ore soltanto era sceso a 840. Io tutte le volte che ho sperimentato con una pressione costante, ho constatato il fatto che il rendimento è andato sempre gradatamente diminuendo, nè mi è mai successo il fatto che in sole 14 ore il rendimento scendesse a meno della metà; due sole volte poi (n. 10 della tabella 3ª e 20 della tabella 9ª) ho osservato un aumento del rendimento ed è stato precisamente quando ho aumentata la pressione dell'acqua filtrante. Farò infine osservare che il rendimento massimo da me ottenuto nella prima ora di filtrazione, con una candela nuovissima e con la pressione di più di 1 atmosfera (tabella 4ª), è stato di 1500 cmc. Main con la pressione un po' inferiore a $^1/_{10}$ di atmo-

quali risulta che per l'acqua del Gorzente, la quale, come ho detto, è molto torbida, alla pressione di una atmosfera, in una candela nuova, il rendimento, che è di l. 1 ½ nella prima ora, va poi rapidamente scendendo nei primi giorni (dopo 2-3 giorni è di un litro soltanto; vedi tabella 4ª) e più lentamente nei giorni successivi; in una candela usata, ma lavata per molto tempo con la soluzione di acido acetico e poi riscaldata a 170° per un'ora, nella prima ora di filtrazione il rendimento è di poco più di un litro (tabella 5ª), lo stesso come in una candela nuova, con acqua filtrante alla pressione di ²/₃ circa d'atmosfera (tabelle 1ª, 2ª e 3ª); a pressione bassissima poi (¹/₁₀ di atmosfera, tabella 8ª) il rendimento è in principio di circa 40 cmc. soltanto all'ora, poi va ancora diminuendo, e dopo 14 giorni di filtrazione continua, è di appena 13 ½ cmc. all'ora (1).

Con acqua della condottura dell'Acquedotto Civico, a bassa pressione, anche in una candela nuova, il rendimento è scarsissimo fin dal principio (½ litro o poco più in un'ora; tabella 6ª) e dopo 7 giorni soltanto scende già a ¼ di litro (cioè solo sei litri in tutta la giornata), quantunque quest'acqua sia limpida; con candele usate e non lavate nella soluzione di acido acetico, ma semplicemente bollite in acqua, il rendimento naturalmente è ancora più basso e insufficiente per i bisogni di una famiglia anche piccola.

---

sfera avrebbe ottenuto nella 1ª ora, anzi anche nella 10ª ora, 1800 cmc.; con la pressione un po' superiore ad ¹/₁₀ di atmosfera, con una candela, è vero, non nuova, ma lavata a lungo con acido acetico, nella 1ª ora io ho ottenuto soltanto 40 cmc. (tabelle 8ª, 9ª, 10ª), cioè ¹/₄₀ di quello ottenuto da Main. Main aggiunge che avendo semplicemente pulito sott'acqua la candela che dava soltanto 350 cmc. all'ora, avrebbe ottenuto, con la stessa pressione, 835 cmc. nella 1ª ora. Siccome tutte le candele da me adoperate hanno dato tutte presso a poco lo stesso rendimento, e siccome esse erano delle stesse dimensioni di quella adoperata da Main, non so capire questa enorme differenza nei risultati.

Per quello poi che riguarda le esperienze delle tabelle 8ª, 9ª e 10ª, farò ancora osservare che, mentre in quelle delle tabelle 8ª e 9ª il rendimento andava di giorno in giorno decrescendo sensibilmente, in quella della tabella 10ª, a partire dal n. 7, esso andava insensibilmente decrescendo, tanto che in 13 giorni esso è diminuito di circa 1 solo cmc. per ora; questa differenza dipende esclusivamente dalla diversità di pressione; nelle esperienze delle tabelle 8ª e 9ª l'acqua che usciva dal bottiglione non veniva sostituita e quindi la pressione diminuiva di giorno in giorno (quando al n. 20 della tabella 9ª, il bottiglione fu nuovamente riempito, il rendimento salì subito da 11 a 22 cmc. per ora); invece in quella della tabella 10ª l'acqua del bottiglione veniva riportata tutti i giorni alla stessa altezza e la pressione quindi era mantenuta costante.

(1) In queste ultime esperienze, il rendimento segnato sulla tabella per le singole giornate è stato calcolato contando il numero di goccie che cadevano dal beccuccio della candela filtrante in 5 minuti; questo numero corrisponde al numero di cmc. di acqua filtrante in un'ora, giacchè corrispondendo 12 goccie a 1 cmc, bisognerebbe, dopo aver moltiplicato per 12 per avere il numero di goccie filtrate in un'ora, dividere per 12 per avere questa quantità espressa in cmc.

Tenendo calcolo della diminuzione del rendimento nelle varie tabelle, si vede che, *ceteris paribus, il rendimento di una candela filtrante diminuisce tanto più fortemente quanto più rapido e più abbondante è il passaggio dei germi con l'acqua filtrata*, cioè quanto più elevata (o per dir meglio quanto più vicina alla temperatura optimum per lo sviluppo delle specie capaci di moltiplicarsi rigogliosamente nell'acqua), è la temperatura di filtrazione.

In questi confronti non dobbiamo tener conto dei dati delle tabelle 1ª e 2ª, perchè nelle esperienze alle quali esse si riferiscono, da una parte l'acqua era straordinariamente torbida, dall'altra la filtraziono rimase interrotta per due intere giornate; nella esperienza della tabella 3ª vi fu pure una interruzione, ma questa durò solo poche ore, e quindi si può trascurarla; a metà esperienza fu aperto di più il rubinetto dell'acqua e fu quindi aumentato il rendimento; ciò non ostante, in questa esperienza il rendimento è andato diminuendo più rapidamente che in quella della tabella 4ª, e in questa più rapidamente che in quella della tabella 5ª (nella 3ª, dopo 12 giorni, era sceso a $\frac{1}{3}$; nella 4ª a meno della metà; nella 5ª a più della metà); orbene, in queste tre successive esperienze, fatte tutte con la stessa acqua del Gorzente, la temperatura è andata successivamente diminuendo, cosicchè sempre più scarso è stato il passaggio dei germi.

Così pure confrontando la tabella 6ª con la 7ª (acqua dell'Acquedotto Civico), si vede che mentre in questa, dopo otto giorni di filtrazione, il rendimento è sceso a meno della metà, in quella, dopo lo stesso tempo, è più della metà. Nè si dica che in questo caso la maggior rapidità della diminuzione del rendimento nella esperienza della tabella 7ª può essere dipeso dal fatto che in questa si è adoperato un filtro già usato e nella esperienza della tabella 6ª un filtro nuovo; nel confronto infatti dei risultati delle tabelle 4ª e 5ª vediamo che si è verificato proprio il contrario. Mi pare dunque che si possa avanzare l'ipotesi che la rapidità e l'abbondanza del passaggio dei germi nell'acqua filtrata hanno una influenza sulla rapida diminuzione del rendimento della candela e credo che questo fatto non possa altrimenti spiegarsi se non con l'ammettere che i germi che si moltiplicano rigogliosamente nello spessore della candela, ne invadono e ne ostruiscono tutti i pori, ostacolando così il passaggio dell'acqua.

Per dimostrare che così realmente stiano le cose, bisogna fare delle esperienze con acqua distillata sterile e con altra ricchissima di germi; appena lo potrò, eseguirò tali esperienze.

***

Perchè dunque il filtro Malliè possa dare acqua in quantità sufficiente, occorre che la pressione dell'acqua filtrante non sia troppo bassa e sarà anche bene ripulire spesso il filtro e farlo bollire in acqua. Questa pratica della frequente pulitura e bollitura del filtro è del resto necessaria anche per evitare che nell'acqua filtrata vi sia un numero straordinario di germi. *Se si vuole che il filtro dia sempre acqua sterile, il numero di giorni dopo il quale il filtro si dovrà ripulire e bollire, varierà a seconda della temperatura alla quale ha luogo la filtrazione; se questa non supera i 12°-13° C., basterà eseguire l'operazione ogni settimana* (tabelle 5ª e 6ª; per l'acqua del Gorzente — tabella 5ª — si potrebbero lasciar passare anche dieci giorni); *se invece raggiunge i 15°-16° C., occorrerà eseguirla almeno ogni cinque giorni* (tabella 7ª); *se poi raggiunge temperature superiori, occorrerà ripeterla ancor più di frequente, cioè ogni due o tre giorni* (tabelle 8ª, 9ª e 10ª).

***

Finchè però si tratta del passaggio traverso al filtro di germi acquatili banali, questo fatto non ha una grande importanza dal punto di vista igienico. Molto più importante sotto questo aspetto è invece lo stabilire se i germi patogeni, che eventualmente si trovino in un'acqua potabile, siano capaci di traversare essi pure il filtro. Se così fosse, il filtro invece di essere di utilità, sarebbe di danno, perchè detti germi patogeni potrebbero venire a trovarsi nell'acqua filtrata in maggior numero che in quella non filtrata.

Ho già riferito (v. pag. 631, 632 e 633) le esperienze fatte a questo proposito coi filtri Chamberland e Berkefeld e ho mostrato come nessun sperimentatore sia riuscito a dimostrare in maniera sicura che i germi patogeni contenuti in un'acqua potabile riescano a traversare tali candele nelle condizioni ordinarie di filtrazione. I risultati positivi delle esperienze di Kirchner non dimostrano nulla, perchè egli all'acqua filtrante aggiungeva del brodo (v. pag. 631); quanto a Pfuhl, egli esperimentò con un altro indirizzo (v. pag. 632) e invece di vibrione del colera e di bacillo del tifo adoperò un vibrione acquatile fosforescente e il *bacterium coli.*

Vero è però che anche i risultati negativi delle esperienze di Nordtmeyer, di Lübbert, di Lunt e di Schöfer coi filtri Berkefeld, e di quelle di Abba coi filtri Chamberland non dimostrano l'assoluta impos-

sibilità di tale passaggio; non quelli di Nordtmeyer, perchè egli non proseguì la ricerca dei germi patogeni nell'acqua filtrata, quando in questa cominciò a riscontrare la presenza dei comuni germi acquatili; non quelli di Schöfer, perchè egli filtrava acqua bollita a lungo e quindi alterata nella sua composizione; non quelli di Abba, perchè egli aggiungeva all'acqua filtrante le emulsioni di colture di tifo e di colera, quando già la candela funzionava da parecchi mesi e quindi l'acqua circostante era straordinariamente ricca di germi acquatili e i pori della candela invasi tutti da tali germi; di più non risulta dalla sua pubblicazione, come neppure da quella di Nordtmeyer, se egli abbia sempre fatto le sue esperienze a una temperatura favorevole all'eventuale sviluppo dei germi patogeni.

Per tutte queste ragioni, oltre che per la necessità di eseguire tali esperienze coi filtri Mallié, diversi cioè da quelli adoperati dagli altri sperimentatori, ho voluto vedere se nelle ordinarie condizioni di filtrazione di un'acqua potabile il passaggio traverso al filtro dei germi patogeni in essa eventualmente contenuti fosse possibile o no. Ho cercato quindi di evitare i difetti di tecnica in cui sono incorsi gli autori sopra nominati, ma nello stesso tempo di mettermi nelle condizioni più favorevoli al possibile sviluppo dei suddetti germi.

Ho perciò, prima di tutto, fatto uso dell'acqua potabile del Gorzente senza sterilizzarla nè con la filtrazione traverso a un filtro sterile (che avrebbe tolto all'acqua le particelle in essa sospese) nè con la ebollizione (che avrebbe alterata la composizione chimica dell'acqua). Ho riempito di quest'acqua un bottiglione collocato sopra una mensola nella stanza dei termostati, in un punto in cui la temperatura oscillava da 22° a 23° C.; poi, mediante un sifone e un tubo di gomma, ho messo il bottiglione in comunicazione col robinetto di un manicotto metallico, dentro il quale avevo messo una candela stetilizzata a 170° C. per 1 ora. Nell'intercapedine fra il manicotto e la candela ho versato una emulsione in acqua del Gorzente non sterilizzata (1) di una coltura in agar di 18 ore a 37° C. di bacilli del tifo (2), emulsione fatta trasportando la sola patina culturale,

(1) Ho preferito adoperare acqua non sterilizzata, perchè siccome l'emulsione riempiva quasi per metà l'intercapedine fra il manicotto e la candela, i bacilli del tifo si trovassero fin dall'inizio dell'esperienza in un'acqua punto alterata dalla sterilizzazione.

(2) Ho adoperato una coltura di 18 ore soltanto per esser sicuro che tutti i bacilli del tifo immessi nell'acqua fossero vivi.

I batteri patogeni che possono trovarsi nelle acque potabili ed essere, per mezzo dell'uso di queste acque, causa di malattie infettive per l'uomo, sono principalmente il vibrione del colera, il bacillo del tifo e quello della dissenteria. Per le nostre contrade, quello che più ci deve preoccupare è il bacillo del tifo; il bacillo della dissenteria e più ancora il vibrione del colera hanno per noi un'importanza molto relativa; ho voluto perciò cominciare le mie esperienze col bacillo del tifo.

Farò osservare che tanto il bacillo del tifo quanto e ancora più il

senza la minima traccia di substrato nutritivo. Tolto il cappuccetto di cotone dal beccuccio della candela, ho messo in funzione il filtro, aprendone il rubinetto. Siccome il dislivello fra il filtro e la superficie libera dell'acqua contenuta nel bottiglione era piccolo (da m. 1. 05 a m. 0. 75), la pressione dell'acqua filtrante era bassissima (da $^1/_{10}$ a $^1/_{14}$ circa di atmosfera) e quindi la filtrazione era estremamente lenta. Sotto al filtro aveva disposto una bacinella, contenente un po' di soluzione al 10 per mille di sublimato corrosivo, cosicchè quando la bacinella era piena di acqua filtrata, la soluzione di sublimato era circa a 1 per mille, più che sufficiente quindi per l'uccisione dei bacilli del tifo che eventualmente passassero con l'acqua filtrata. Accanto al filtro avevo collocata una fiammella a gas, inclinata in modo da riscaldare l'acqua contenuta nel filtro, portandola ad una temperatura di circa 28° C., favorevole quindi per sè stessa allo sviluppo dei bacilli del tifo che si trovavano immersi in quell'acqua a quella temperatura (1).

Si trattava ora di trovare un metodo che permettesse di scoprire con facilità, speditezza e sicurezza i bacilli del tifo eventualmente presenti nell'acqua filtrata. La difficoltà di scoprirli dipendeva dal fatto che essi, dato che nell'acqua fossero presenti, dovevano trovarvisi misti a una quantità enorme di altri batteri; lo sviluppo delle colonie provenienti da questi batteri poteva quindi impedire il riconoscimento di quelle eventualmente provenienti dai bacilli del tifo. Infatti, o l'acqua filtrata veniva seminata nelle capsule senza prima diluirla in acqua sterile e allora le colonie sarebbero state così fitte in una capsula da essere impossibile di distinguere in mezzo ad esse quelle del tifo, tanto più che queste, ostacolate nel loro libero sviluppo da tutte le altre ad esse addossate, non avrebbero potuto assumere un aspetto più o meno caratteristico; o

---

vibrione del colera e fino a un certo punto anche il bacillo della dissenteria da me adoperati provenivano da campioni coltivati da lungo tempo in laboratorio e passati per una lunga serie di trasporti su terreni culturali, senza che subissero mai il passaggio traverso a un animale. Essi erano quindi adattati alla vita saprofitica e quindi in condizioni favorevoli per moltiplicarsi nell'acqua e passare traverso al filtro, dato che questa moltiplicazione e questo passaggio fossero possibili.

(1) L'altezza della fiammella, la sua distanza dal filtro e la sua inclinazione erano state da me regolate prima, ponendo dentro al filtro pieno di acqua un termometro, che dalla parte della fiammella segnava circa 28° .5 e dalla parte opposta 27°5; tutti i giorni poi, anzi più volte al giorno, per assicurarmi che la fiammella non riscaldasse troppo, anche in un sol punto, il manicotto metallico del filtro, facevo scorrere lungo il manicotto, dalla parte della fiammella, un dito. Inoltre, a esperienza terminata, immergendo il termometro nell'acqua del filtro, potei constatare che la temperatura oscillava appunto di pochi decimi di grado attorno ai 28° C. Che infine la temperatura non fosse troppo elevata, me lo provò anche il fatto che nell'acqua filtrata passarono sempre alcuni germi acquatili, i quali poi si mostrarono incapaci di svilupparsi a 40° C. La possibilità di avere una temperatura abbastanza alta, uniforme e costante dipendeva dal fatto che il filtro si trovava in un ambiente a temperatura quasi costante (22°-23° C.), che l'acqua arrivava in esso con la stessa temperatura di 22°-23° C. e che nel filtro restava quasi stagnante (ne uscivano de 2 a 4 goccie al minuto), cosicchè aveva tutto il tempo di riscaldarsi.

l'acqua filtrata veniva prima fortemente diluita (a 1 per cento e anche più fino a 1 per 12,000) prima di seminarla nelle capsule, per avere le singole colonie ben separate e distinte, e allora, se i bacilli del tifo si trovavano nell'acqua filtrata in piccolo numero, si correva rischio che nessuno di essi venisse a trovarsi nella poca acqua che si seminava nelle capsule.

Siccome io avevo già constatato il fatto che le specie di germi che passano nell'acqua filtrata sono per la maggior parte incapaci di moltiplicarsi alla temperatura di 37° C (1), così pensai di ricorrere a una temperatura elevata, che mentre permettesse lo sviluppo dei bacilli del tifo e anzi a questo fosse favorevole, impedisse quello degli altri batteri. Perciò, contemporaneamente alla semina dell'acqua filtrata in capsule di gelatina che poi mantenevo a 22° C. e che dovevano servirmi per stabilire quando cominciava il passaggio dei germi nell'acqua filtrata e per procedere di giorno in giorno al conteggio di questi germi, feci anche delle semine in capsule d'agar, che mantenevo in un termostato a 39°-40° C. circa (2).

Il risultato ottenuto fu davvero sorprendente. Nella capsule in gelatina seminai il primo giorno 12 goccie (1 cmc.) di acqua filtrata, nel secondo giorno 6 goccie ($^1/_2$ cmc.), nel terzo, quarto e quinto giorno una sola goccia ($^1/_{12}$ cmc.) e nei giorni successivi soltanto $^1/_{120}$ di cmc. e perfino $^1/_{240}$ e $^1/_{12000}$ di cmc.; invece nelle capsule in agar seminai sempre almeno 12 goccie (1 cmc.) di acqua filtrata, nei primi giorni anzi 24 goccie (2 cmc.), perchè la filtrazione era più rapida e occorreva quindi minor tempo per raccogliere 24 goccie.

Nelle capsule in gelatina, a cominciare dal secondo giorno, constatai sempre lo sviluppo di numerose colonie, appartenenti prima a una sola specie (bacillo lungo e sottile, immobile, non fluidificante la gelatina), poi a due specie (detto bacillo e un altro più corto e più grosso, a colorazione bipolare, anch'esso immobile, ma fluidificante la gelatina). La specie batterica dunque, che in questa esperienza apparve per la prima nell'acqua filtrata, non fu nè quella apparsa per prima nelle esperienze delle tabelle 1ª, 2ª, 3ª e 4ª, nè quella della espe-

---

(1) Già nelle numerosissime analisi batteriologiche (da me eseguite nel laboratorio di batteriologia della Sanità Pubblica) di campioni di acque potabili provenienti da tutte le parti d'Italia, avevo osservato che nelle capsule in agar mantenute a 37° C. si aveva un numero di colonie inferiore sempre, spesso anzi di molto inferiore, a quello delle capsule in gelatina mantenute circa a 20° C.

(2) E' noto come il bacillo del tifo sui comuni substrati nutritivi si sviluppi anche alla temperatura di 45°-46° C.; io però non ho voluto raggiungere mai questa temperatura troppo elevata, perchè essa non è certo molto favorevole allo sviluppo dei bacilli del tifo; mi sono contentato quindi della temperatura di 40° C. al massimo, alla quale mi sono assicurato che il campione di bacillo del tifo che io avevo in esame, seminato in un tubo di agar, si sviluppava rapidamente e rigogliosamente.

rienza della tabella 5ª; quanto ai vibrioni, questi probabilmente non erano presenti nell'acqua da filtrare, come avevo già constatato un mese prima (v. pag. 650); il bacillo a colorazione bipolare invece era presente nell'acqua da filtrare, ma invece di passare per il primo, come era accaduto nell'esperienza della tabella 5ª, passò per secondo, associato all'altro bacillo e durante tutta l'esperienza i batteri contenuti nell'acqua filtrata furono tutti dell'una o dell'altra di queste due sole specie. Sul numero di queste e sulla loro natura, cioè *sulla flora batterica dell'acqua filtrata, influisce quindi non solo la flora batterica dell'acqua da filtrare* (v. pag. 651), *ma anche la temperatura alla quale ha luogo la filtrazione, e ciò è naturale, perchè mentre una data temperatura è più favorevole allo sviluppo di una data specie batterica, un'altra temperatura notevolmente diversa può essere più favorevole allo sviluppo di un'altra specie batterica.*

Le colonie sviluppatesi nelle capsule in gelatina erano, come ho detto, numerosissime; anche negli ultimi giorni (a cominciare dal n. 8 della tabella 8ª), nelle capsule in cui avevo seminato soltanto $^1/_{12000}$ di cmc. dell'acqua filtrata, le colonie furono sempre, dopo un solo giorno di incubazione, almeno 300, fino a 500 e più (dal n. 8 al n. 14). *Invece nelle capsule in agar a 39°-40° C.*, anche dopo due, tre, quattro giorni di incubazione, *non trovai mai neppure una sola colonia* (1), *quantunque la quantità d'acqua seminata fosse 12,000 volte più grande.*

Evidentemente l'assenza di sviluppo di colonie nelle capsule in agar deve attribuirsi unicamente al fatto che le specie batteriche contenute nell'acqua filtrata erano assolutamente incapaci di svilupparsi alla temperatura di 39°-40° C. Questa interpretazione non aveva bisogno di ulteriore conferma; ciò non ostante, per eliminare il dubbio che l'assenza di sviluppo potesse dipendere dalla composizione dell'agar, per due giorni di seguito (n. 9 e 10), insieme con la capsula in agar mantenuta a 39°-40° ne allestii un'altra, in cui seminai una o due goccie soltanto di acqua filtrata e che mantenni a 22° C. circa, insieme con quelle in gelatina; anche in queste capsule in agar constatai dopo un solo giorno lo sviluppo di numerosissime colonie appartenenti a due specie diverse. Inoltre un giorno (n. 11) tenni successivamente, ciascuno per 1 2 ora, due tubi di brodo sotto il beccuccio della candela filtrante; il rendi-

(1) A dire il vero qualche volta trovai una o anche due colonie, le quali però già macroscopicamente si distinguevano da quelle sviluppatesi nelle capsule di gelatina e quindi provenivano da germi dell'aria caduti dentro la capsula, come già ho detto a pag. 647; qui però, a differenza di quello che era avvenuto nelle precedenti esperienze, non si ebbero mai colonie di *Penicillium glaucum*, perchè questo ifomiceta non si sviluppa a 40° C.

mento essendo in quel giorno 15 ¼ cmc. all'ora, la quantità di acqua filtrata aggiunta al brodo fu di 8 cmc.; portai una provetta nel termostato a 39° C., l'altra nella stanza dei termostati a 22° C.; in questa constatai fino dal giorno seguente l'intorbidamento del brodo; nell'altra invece anche dopo tre o quattro giorni il brodo era perfettamente limpido. Infine una volta (n. 14) feci cadere dell'acqua filtrata in due provette contenenti acqua del Gorzente sterilizzata (1); ne portai una 39° C., l'altra a 22° C. e dopo due giorni da ciascuna provetta feci delle colture piane in gelatina; la capsula seminata con l'acqua tenuta a 39° C. si mantenne sterile, in quella seminata con l'acqua tenuta a 22° C. si svilupparono numerose colonie delle due specie sopra nominate.

In tutte queste esperienze, proseguite per 14 giorni di seguito, se nell'acqua filtrata e seminata in agar o in brodo a 39°-40° C. (acqua la cui quantità fu di 1 cmc. almeno, talora di 2 e una volta anche di 8) ci fosse stato anche un solo bacillo del tifo, questo avrebbe dovuto svilupparsi e dar luogo o a una colonia tifica nelle piastre d'agar, o a intorbidamento nella provetta di brodo. Invece non si verificò mai nulla di tutto questo e potei così ottenere la dimostrazione sicura che *i bacilli del tifo, per quanto fossero stati aggiunti all'acqua filtrante in quantità innumerevole* (2) *e fossero stati mantenuti in condizioni di temperatura favorevoli al loro sviluppo, pure non riuscirono mai a passare, neppure dopo 14 giorni di filtrazione continua, nell'acqua filtrata*; a fortiori *quindi essi non devono riuscire a passare nelle ordinarie condizioni di filtrazione delle acque potabili, condizioni che sono meno favorevoli, perchè la temperatura generalmente è più bassa e perchè i bacilli del tifo non si trovano mai nelle acque potabili in quantità così grandi.*

Ho voluto riferire per esteso *il metodo da me seguìto per la ricerca dei bacilli del tifo nell'acqua filtrata*, perchè, per quanto mi consta, esso non è stato adottato da nessuno di quelli che si sono occupati dell'argomento (3); eppure esso *è un metodo facilissimo, speditissimo e, se non*

---

(1) In questo caso dovetti per forza ricorrere alla sterilizzazione dell'acqua, che tenni per un'ora nella pentola di Koch.

(2) Al principio dell'esperienza, siccome l'emulsione aggiunta era straordinariamente ricca di bacilli del tifo (un'intiera patina culturale di un tubo d'agar), si può dire che l'acqua filtrante contenesse quasi esclusivamente i bacilli del tifo, misti a un numero relativamente insignificante di batteri acquatili. Questi saranno stati da 400 a 600 per cmc., mentre quelli del tifo in principio saranno stati migliaia e migliaia per cmc., nelle migliori condizioni quindi per sostenere la concorrenza vitale dei batteri acquatili e passare, se ciò fosse possibile, soli o insieme con essi, traverso alla parete filtrante.

(3) Kirchner p. es. (v. pag. 631) pare che facesse delle colture piane in gelatina. Infatti nella prima serie di esperienze (filtrazione di brodo-colture pure) egli lasciava cadere una goccia del filtrato in capsule di

in tutti i casi (1), *certo nella maggior parte dei casi, di riuscita sicura per rintracciare i germi patogeni in un'acqua filtrata, ricchissima di germi acquatili.*

Petri in cui poi versava della gelatina; nella seconda serie (filtrazione di acqua dell'Ihme, inquinata con brodocolture di colera o di tifo) non dice espressamente di aver seguito lo stesso metodo, ma pare di sì.

Altri autori, come NORDTMEYER (v. pag. 632) e SCHÖFER (v. pag. 631), dicono che facevano delle colture arrotolate (Schöfer) o piane (Nordtmeyer), ma non aggiungono se in agar o in gelatina, e a quale temperatura. Veramente, per quel che riguarda Schöfer, egli non aveva nessuna difficoltà da superare per la ricerca dei bacilli del tifo o dei vibrioni del colera, perchè egli filtrava acqua sterilizzata.

PFUHL (v. pag 629) faceva cadere l'acqua filtrata in palloni di acqua peptonizzata (e ciò non solo per il vibrione fosforescente, ma anche per il *Bacterium coli*), che poi portava a 37° C. e da quelli intorbidati faceva trasporti su piastre di agar comune per il vibrione fosforescente e di agar Drigalski per il *B. coli*: non dice se si sviluppassero altri germi e ad ogni modo egli non sperimentò con batteri patogeni, non ricorse a temperature superiori ai 37° C. e non seminava direttamente l'acqua in piastre di agar.

Analogo procedimento aveva già seguito ABBA (v. pag. 633). « Quanto alla tecnica messa in opera per la dimostrazione di questi bacilli, usai per il v. colerigeno il noto brodo di Dunham-Koch e per gli altri due, b. del tifo e b. coli, un brodo così composto: acqua gr. 1000; peptone secco gr. 10; Na Cl gr. 5; lattosio gr. 20; Na_2 CO_3 gr. 1; soluz. alcool. 1% di fenolftaleina cmc. 0. 5. Il b. coli produce la decolorazione completa del brodo in poche ore; il b. tifo in 3-4-5 giorni. Tutte le volte che non si ha decolorazione dei brodi, non si ha presenza del b. coli o di altro dotato della stessa proprietà; l'esame microscopico e le colture isolanti chiariscono poi la cosa ». L'A. non dice espressamente a quale temperatura manteneva il brodo in cui aveva seminato l'acqua filtrata; da quello però che dice in seguito, parlando dell'esame batteriologico delle acque potabili, pare che tale temperatura fosse di 37° C. Dice l'A. che i risultati di tutte le sue esperienze dirette a ricercare la presenza dei suddetti germi patogeni nell'acqua filtrata furono tutti negativi, ma non dice se il brodo rimase sempre sterile o se in esso si svilupparono altri batteri. Ad ogni modo, anch'egli come Pfuhl non ricorse alla semina diretta dell'acqua in piastre d'agar e alla esposizione di queste piastre a temperatura elevata, superiore ai 37° C.

Citerò ancora POTTEVIN (*Statistique démographique et médicale de la ville du Havre*. Revue d'hygiène, XXVI, pag. 377, 1904) il quale, mentre quando filtrava (traverso a un filtro di sabbia finissima e molto *tamisé*, alta quasi 30 cm.) dell'acqua sterile cui aggiungeva un'emulsione di b. del tifo o di b. coli, faceva delle colture in brodo a 35° C. per constatare se l'acqua filtrata era sterile o conteneva il b. tifo o coli, quando filtrò dell'acqua di condottura (che dopo 2 settimane di filtrazione non era più sterile) contenente b. coli, non dice come fece per constatare (per 13 mesi di seguito) l'assenza del b. coli nell'acqua filtrata.

(1) Potrebbe infatti darsi che con qualche acqua, a causa della sua flora batterica, passassero nell'acqua filtrata dei batteri capaci di svilupparsi anche a 39°-40° C. e allora il metodo da me proposto e seguito presenterebbe un vantaggio molto più limitato. In questi casi si potrebbe provare a spingere la temperatura delle colture fino a 42°-43° e occorrendo anche fino a 45°; a questa temperatura, se non tutti, certo una parte dei batteri acquatili contenuti nell'acqua filtrata non si svilupperebbe e sarebbe così facilitata ugualmente la ricerca del bacillo del tifo. Vedremo che questo caso si è verificato nella esperienza da me fatta con l'acqua dell'Acquedotto Civico cui avevo aggiunto un'emulsione di

Inoltre tale metodo di ricerca mi ha suggerito una spiegazione dei risultati talora sorprendenti e meravigliosi che alcuni autori dicono di avere ottenuto nella filtrazione delle acque potabili traverso ai filtri Chamberland e Berkefeld (1) e che io ho già riferito nel riassunto bibliografico. Così p. es., per quel che riguarda i risultati ottenuti da Miquel coi filtri Chamberland (v. pag. 627), farò osservare che egli manteneva i palloni e le damigiane di brodo in cui aveva aggiunto l'acqua filtrata alla temperatura di 35° C.; molto probabilmente la mancanza di intorbidamento del brodo dovette dipendere dalla temperatura piuttosto elevata alla quale egli espose i palloni (2).

Quanto agli altri autori che avrebbero trovata sterile l'acqua filtrata anche dopo moltissimi giorni di filtrazione, osserverò che molti tra essi non dicono a quale temperatura mantenessero le colture di acqua filtrata; tale è p. es. il caso di Freudenreich (v. pag. 627), il quale lasciava cadere in tubi di brodo un po' dell'acqua filtrata tra-

---

vibrioni del colera; il metodo da me adottato è stato vantaggioso anche in questo caso, benchè non abbia voluto spingere la temperatura di coltura al di sopra dei 38° C., ed è stato vantaggioso non solo perchè il numero di colonie sviluppatesi nelle capsule d'agar era relativamente piccolo, ma anche e sopratutto perchè esse non comparvero che dopo due giorni.

Più complicato sarebbe il caso in cui nell'acqua sottoposta alla filtrazione ci fosse il *Bacterium coli*; qualora questo riuscisse a passare traverso al filtro (possibilità questa esclusa dalla esperienza di Pottevin — vedi nota precedente —, di Abba, ecc.), gli individui presenti nell'acqua filtrata si svilupperebbero nelle capsule d'agar a 40°, dando luogo alla formazione di colonie simili a quelle tifiche; in questo caso quindi occorrerebbe un esame lungo e accurato, per stabilire a quale dei due bacilli apparterrebbero le colonie sospette. Ma anche in questo caso il metodo sarebbe vantaggioso, perchè impedirebbe lo sviluppo di altri batteri presenti nell'acqua filtrata.

(1) Per i motivi detti altrove non mi occupo dei risultati che sarebbero stati ottenuti coi filtri Mallié.

(2) Ho voluto anche io provare se i germi contenuti nell'acqua filtrata dell'esperienza della tabella 8ª e incapaci di sviluppo a 39°-40° C., ne fossero anche incapaci a 35° C.; nelle provette di brodo e nelle capsule d'agar allestite come ho detto sopra e tenute a 35°-36° C. non constatai nè l'intorbidamento nè lo sviluppo di colonie. La sola differenza che riscontrai tra le colture a 39°-40° e quelle a 35°-36° C. fu questa: mentre le prime, portate a 22° C. circa, anche dopo un solo giorno di esposizione a 39°-40°, rimanevano perfettamente sterili, quelle mantenute a 35°-36° C. anche per due giorni, portate a 22° C. davano luogo a intorbidamento (del brodo) e a sviluppo di colonie (su piastre d'agar). Il comportamento, rispetto alla temperatura, delle specie batteriche (due almeno) contenute in questa acqua filtrata è dunque molto singolare; esse infatti si sviluppano rigogliosamente a 28° C. (nell'acqua; temperatura della filtrazione), non si sviluppano più a 35° C., e a 39°-40° C. (in agar, in brodo e anche nell'acqua) restano uccise in poco tempo (uno o due giorni). Mi basta per ora avere accennato a questo fatto; mi riservo di studiare più accuratamente queste ed altre specie e le condizioni precise di temperatura favorevoli al loro sviluppo, o capaci semplicemente di impedirlo, oppure capaci di uccidere i germi stessi.

verso a filtri Chamberland. Di altri autori infine, come Prochnik (vedi pag. 627), di de Haan e Straub, di Koettstorfer (v. pag. 629); questi avrebbe trovato che i filtri Berkefeld sono capaci di dare acqua sterile per 52 giorni almeno), ecc., non ho potuto leggere i lavori originali, cosicchè non so neppure se essi dicano a quale temperatura mantenessero i terreni culturali adoperati per l'esame batteriologico dell'acqua filtrata.

Nè è da dirsi che avendo alcuni almeno di questi autori constatata la presenza di germi nell'acqua filtrata dopo un certo numero di giorni di filtrazione, il metodo da essi seguito, qualunque esso sia stato (qualunque cioè sia stata la temperatura a cui mantennero le loro colture), era buono. Se in realtà essi avessero esposto i terreni in cui avevano seminato l'acqua a una temperatura alta, potrebbe darsi che questa non fosse stata favorevole allo sviluppo delle specie batteriche passate per le prime, pur essendo favorevole allo sviluppo delle altre specie passate in seguito, cosicchè di fatto l'acqua filtrata poteva già contenere dei germi prima ancora del giorno in cui essi non la trovavano più sterile. Vedremo infatti che questo caso si è verificato nella esperienza con l'acqua dell'Acquedotto Civico riportata nella tabella 9ª; mentre nelle colture piane in gelatina, tenute a 22° C., si svilupparono delle colonie fin dal 3° o dal 4° giorno di filtrazione, in quelle in agar, mantenute a 37°-38°, si riscontrarono delle colonie soltanto a cominciare dal 7° giorno di filtrazione.

Potrebbe darsi piuttosto che, nelle esperienze di alcuni degli autori sopra nominati, l'acqua filtrata fosse realmente priva di germi e che il fatto di averla ottenuta sterile anche dopo moltissimi giorni di filtrazione sia dipeso dalla qualità dell'acqua adoperata; abbiamo infatti già veduto (v. pag. 644) come la qualità di un'acqua, in rapporto più specialmente alla sua flora batterica, possa influire sulla rapidità con la quale i germi compaiono nell'acqua filtrata.

L'unica obbiezione che mi pare si potrebbe sollevare contro l'esperienza da me ora riferita e dalla quale risulterebbe che i bacilli del tifo, contenuti in un'acqua potabile, non riescono ad attraversare le pareti di un filtro Malliè (e quindi molto probabilmente neppure quelle di un filtro Chamberland o Berkefeld), neppure in condizioni di temperatura favorevoli al loro sviluppo, è che i bacilli del tifo sono stati aggiunti all'acqua da filtrare in numero straordinariamente grande sì, ma tutti in una volta, cioè in condizioni troppo diverse da quelle che succedono naturalmente nella inquinazione di un'acqua potabile. Data la grande massa di un'acqua condottata, nella quale, per una causa qualunque di inquinamento, siano arrivati dei bacilli del tifo, questi

verranno sì a trovarsi nell'acqua molto diluiti, però potranno con l'acqua stessa pervenire in un filtro non tutti assieme, ma successivamente, anche per più giorni di seguito. Potrebbe quindi darsi che con questo continuo afflusso di nuovi bacilli del tifo, questi riuscissero a valicare la parete del filtro e a passare nell'acqua filtrata. Per avvicinarmi di più a queste condizioni naturali di inquinamento di un'acqua potabile, verso la metà dell'esperienza, a cominciare cioè dal n. 10, ho aggiunto all'acqua filtrante, ogni due giorni, una nuova emulsione di bacilli del tifo, provenienti da una coltura in agar a 37° C., di 18 ore; non ostante queste nuove aggiunte, ripetute per tre volte, non ho mai potuto riscontrare nell'acqua filtrata la presenza di bacilli del tifo.

Tutte tre le volte che dovetti aprire la custodia metallica del filtro per versarvi l'emulsione di bacilli del tifo (n. 10, 12 e 14), ne profittai per prelevare dei campioni dell'acqua contenuta nel filtro stesso e vedere se in quest'acqua si ritrovavano ancora vivi i bacilli del tifo immessi con la precedente emulsione. Per rintracciare questi bacilli ricorsi allo stesso metodo adoperato per scoprirli nell'acqua filtrata, cioè feci delle colture piane in agar che mantenni a 40° C. circa, e altre in gelatina che mantenni a 22° C. In queste ultime, in cui avevo messo 1/100 di cmc. di acqua, constatai fin dal giorno seguente lo sviluppo di numerose colonie, di cui molte rapidamente ed estesamente fondenti, che mi impedirono di procedere al conteggio delle colonie stesse e all'esame della specie batterica alla quale esse appartenevano; mi fu quindi impossibile verificare se in mezzo ad esse ce ne fosse qualcuna costituita da bacilli del tifo. In quelle in agar invece, in cui avevo messo 1/10 di cmc. di acqua, constatai (in quelle del n. 12 e 14), fin dalla 10ª ora successiva alla semina, lo sviluppo di molte colonie, che poi all'esame microscopico e culturale si rivelarono per colonie tifiche; tali colonie non si svilupparono invece nella capsula del n. 10 e ne conclusi perciò che i bacilli del tifo immessi nell'acqua filtrante restavano in questa vivi per due giorni almeno (dal n. 10 al n. 12 e dal n. 12 al n. 14), ma che dopo 9 giorni (dal n. 1 al n. 10) erano morti o che per lo meno la loro presenza nell'acqua non era più rivelabile. *Non ho potuto quindi stabilire con esattezza quando i bacilli del tifo scomparivano dall'acqua filtrante, ma ad ogni modo essi vi si trovavano ancora dopo un periodo di tempo più lungo di quello osservato da Abba* (v. pag. 632, nota 1), *il quale nelle sue esperienze non li ritrovò già più dopo 1-2 giorni.*

Aggiungerò infine che nelle colture piane in agar a 40° C. dell'acqua del manicotto metallico, dopo due giorni di incubazione, comparvero (in quelle del n. 12 e 14 accanto alle colonie tifiche già bene sviluppate, in quella del n. 10 sole) delle colonie che all'esame microscopico e cul-

turale si mostrarono costituite da un bacillo mobile, fluidificante la gelatina. Si trattava dunque di un germe capace di svilupparsi anche a 40° C., ma non così rapidamente come il bacillo del tifo; dato anche quindi che tale germe fosse riuscito a passare traverso al filtro, la sua presenza nell'acqua filtrata non avrebbe ostacolato affatto la ricerca del bacillo del tifo, il quale si sarebbe sviluppato prima, come è accaduto nell'esame dell'acqua filtrante. Vedremo che un caso analogo si è presentato nell'esperienza della tabella 9ª eseguita coll'acqua dell'acquedotto civico, inquinata coi vibrioni del colera; nelle colture in agar dell'acqua filtrata mantenute a 38° C. si svilupparono alcune colonie, ma soltanto dopo due giornate di incubazione a 38° C.

***

Terminata l'esperienza con i bacilli del tifo, ne ho intrapresa un'altra coi vibrioni del colera.

Il procedimento seguito è stato lo stesso, con qualche leggera variante. Invece dell'acqua del Gorzente ho adoperata quella dell'Acquedotto Civico. Invece di aggiungere l'intiera patina culturale di un tubo d'agar, ne aggiunsi un'ansa soltanto, ripetendo tale aggiunta ogni due, tre o quattro giorni, cioè per ben undici volte durante l'esperienza che prolungai per 30 giorni; in questa esperienza quindi mi avvicinai ancora di più alle condizioni naturali di inquinamento. La temperatura dell'acqua filtrante fu durante tutto il corso dell'esperienza di 30° C. circa. Per rintracciare nell'acqua filtrante i vibrioni del colera in essa eventualmente contenuti, ricorsi allo stesso sistema delle colture piane in agar mantenute ad alta temperatura; solo, siccome il vibrione del colera non si sviluppa a temperature così elevate come il bacillo del tifo, ma soltanto, pare, fino a 40° C., non sorpassai mai la temperatura di 38° C. Approfittando poi del fatto che il vibrione del colera si sviluppa rapidamente e rigogliosamente in acqua peptonizzata, contemporaneamente alle colture piane in agar, ne feci altre in provette di acqua peptonizzata in cui lasciavo cadere tre o quattro centimetri cubi di acqua filtrata e che poi mantenevo a 38° C. circa. Per calcolare il numero di germi contenuti in 1 cmc. di acqua filtrata, feci le solite colture piane in gelatina a 22° C., con le solite diluizioni.

Anche in questa esperienza si verificò il fatto già osservato in quella precedente, che cioè le numerose colonie sviluppatesi nelle colture in gelatina appartenevano prima a una sola specie, poi a due soltanto per tutto il corso dell'esperienza. Queste specie furono quelle stesse che avevo già riscontrate presenti nell'acqua filtrata delle esperienze delle tabelle 6ª e 7ª (v. pag. 650), cioè prima i cocchi immobili, non fluidificanti la gelatina, poi i bacilli mobili, fluidificanti la gelatina, producenti un

pigmento verdastro e emananti un odore fetidissimo. A differenza dunque di quello che accadde per l'acqua del Gorzente (v. pag. 660), qui le due specie batteriche si succedettero nello stesso ordine che nelle esperienze delle tabelle 6ª e 7ª e la fortissima differenza di temperatura (nella esperienza della tabella 9ª circa venti gradi in più che in quella della tabella 6ª) non influì sulla flora batterica dell'acqua filtrata.

Quanto alle capsule in agar tenute a 38° C., non potei mai riscontrare in esse lo sviluppo di colonie, che poi all'esame microscopico e colturale si rivelassero per colonie di vibrioni del colera. Le colture in agar anzi si mantennero per qualche giorno perfettamente sterili (salvo qualche colonia isolata, dovuta come al solito a un inquinamento accidentale dall'aria), anche quando nelle capsule in gelatina si svilupparono le prime colonie (di cocchi immobili, non fluidificanti). Quando però nelle colture piane in gelatina comparve la seconda specie di colonie (bacilli mobili e fluidificanti), cioè dal n. 7 in poi, anche nelle capsule d'agar si svilupparono delle colonie piccolissime, che all'esame microscopico e culturale si mostrarono costituite da questi stessi bacilli mobili e fluidificanti.

Dunque delle due specie batteriche presenti nell'acqua filtrata, una sola era capace di svilupparsi anche a 38° C. oltre che a 20°-22° C. e perciò anche in questo caso il metodo delle colture piane in agar, ad alte temperature, fu vantaggioso, sia perchè nei primi giorni questa specie batterica acquatile capace di svilupparsi anche a 38° C. non era presente nell'acqua filtrata, sia perchè gli individui di questa specie si mantennero per lungo tempo in quantità molto inferiore a quella degli individui dell'altra specie (circa 1/4 del quantitativo batterico totale; (vedi tabella 9ª dal n. 7 al n. 15), sia infine perchè, mentre nelle colture in gelatina a 22° C. le colonie di questi bacilli erano discretamente sviluppate dopo un giorno e mezzo soltanto di incubazione, in quelle in agar a 38° C. esse non comparivano distintamente visibili che dopo due giorni. Per tutti questi motivi dunque, se nell'acqua filtrata ci fossero stati dei vibrioni del colera, lo sviluppo tardivo, nelle capsule di agar, delle scarse colonie di bacilli mobili e fluidificanti la gelatina non avrebbe ostacolato affatto quello delle colonie di vibrioni del colera e queste avrebbero dovuto comparire fin dal primo giorno, come vedremo che è accaduto per le colture piane in agar a 38° C. dei campioni di acqua del filtro. Quanto alle colture in provette di acqua peptonizzata mantenute a 38° C., dirò che queste provette si mantennero sterili per tutto il tempo che restarono tali le capsule di agar a 38° C., cioè fino al n. 7; a partire dal giorno successivo cominciò anche in esse a manifestarsi, dopo un giorno o un giorno e mezzo di incubazione a 38° C.,

un intorbidamento finamente polverulento e omogeneo. Questo intorbidamento però era molto scarso, appena visibile e tale si manteneva, anche se le provette venivano lasciate nel termostato per parecchi giorni. In nessuna di esse constatai la formazione della pellicola superficiale propria delle colture di colera e in nessuna di esse trovai dei vibrioni all'esame microscopico in goccia pendente e in preparati colorati; esse invece apparvero a tale esame come colture pure del solito bacillo mobile e fluidificante la gelatina.

Dunque neppure il vibrione del colera è riuscito, dopo un mese di filtrazione continua, a passare traverso al filtro Malliè insieme con l'acqua filtrata, benchè le condizioni di filtrazione fossero favorevolissime a tale passaggio.

Per quello che riguarda l'esame batteriologico dell'acqua endocontenuta nel filtro, esame istituito con campioni prelevati tutte le volte che aprivo la custodia metallica per aggiungere una nuova emulsione di vibrioni del colera; dirò che nelle colture piane in gelatina a 22° C., allestite con frazioni piccolissime di cmc. di acqua filtrante, ottenni lo sviluppo rapido di numerose colonie, in mezzo alle quali non mi riuscì che qualche rara volta e con molta difficoltà a scoprirne qualcuna di colera. Invece nelle colture piane in agar a 38° C. constatai, dopo circa 12-14 ore di incubazione, lo sviluppo di colonie che l'esame microscopico e colturale rivelò costituite di vibrioni del colera. Ciò accadde in tutte quante le capsule, meno in quelle dei numeri 22 e 24. Siccome in questi due casi avevo lasciato trascorrere rispettivamente quattro e cinque giorni dall'immissione (nell'acqua del filtro) della emulsione di *vibrioni del colera*, ne conchiusi che questi *si mantenevano vivi nell'acqua filtrante per tre giorni, ma che al quarto giorno erano già tutti scomparsi* o che almeno a me non riuscì di ritrovarli. Dirò anche che nelle capsule dei numeri 6, 8, 10, 12 e 23 ho costantemente trovato un numero di colonie di colera maggiore che in quelle dei numeri 4, 15, 18 e 27 e siccome tutte le volte che aggiungevo una emulsione di vibrioni del colera cercavo di aggiungerne presso a poco la stessa quantità (un'ansa ugualmente carica di una coltura in agar di 18 ore), ne conchiusi che *dopo tre giorni già una parte dei vibrioni colerigeni versati nell'acqua del filtro erano scomparsi da questa.*

Anche qui ad ogni modo i miei risultati non collimano con quelli ottenuti dall'Abba (v. pag. 632, nota 1), il quale dice che nelle sue esperienze i vibrioni del colera scomparivano dall'acqua del filtro già dopo un giorno. Potrebbe darsi che questa differenza di risultati dipenda dalla tecnica diversa messa in opera per scoprire nell'acqua stessa i germi patogeni aggiunti, ma bisogna tener presente che altre cause possono

avere influito sulla diversità di risultati e cioè la diversa qualità dell'acqua adoperata (sia in rapporto alla sua composizione, sia in rapporto alla sua flora batterica); la diversa temperatura di filtrazione, la diversa pressione dell'acqua filtrante (1 atmosfera nell'esperienza di Abba, 1/10 di atmosfera in quella mia), ecc.

Anche qui, come nella precedente esperienza, in tutte le capsule di agar a 38° C., in cui avevo seminato un po' di acqua del filtro e in cui dopo 12-14 ore avevo constatato lo sviluppo di colonie di colera, dopo due giorni accanto a queste trovai sviluppate altre colonie più piccole, appartenenti a due o tre specie, tra cui il solito bacillo mobile e fluidificante la gelatina.

La presenza, nell'acqua del filtro, di questi batteri capaci di svilupparsi anche a 38° non impedì la constatazione della presenza del vibrione del colera, e se questo fosse stato presente nell'acqua filtrata, anche all'esame batteriologico di questa lo si sarebbe dovuto rintracciare.

***

Dopo avere constatato che nè i bacilli del tifo nè i vibrioni del colera, contenuti in un'acqua potabile filtrante traverso ad un filtro di porcellana d'amianto, sono capaci di traversare le pareti di questo filtro, neppure se mantenuti in condizioni favorevolissime al loro sviluppo, e dopo avere così confermato i risultati ottenuti con questi stessi germi patogeni da Schoefer, da Lübbert e da Nordtmeyer per i filtri Berkefeld e da Abba per i filtri Chamberland, ho voluto esperimentare con un altro batterio patogeno che può trovarsi nelle acque potabili e infettare per questa via l'uomo, cioè il bacillo della dissenteria. Questa esperienza mi è sembrata tanto più interessante, in quanto che nessuno degli autori che si sono occupati di vedere se i batteri patogeni contenuti in un'acqua siano capaci di passare traverso ai filtri Chamberland, Berkefeld, ecc., ha istituito degli esperimenti con questo bacillo (1).

Il procedimento seguito è stato lo stesso che nelle due precedenti esperienze, con qualche leggera variante. Invece dell'acqua dell'acquedotto De Ferrari-Galliera o dell'acquedotto civico ho adoperata quella dell'acquedotto Nicolay. La pressione dell'acqua filtrante è stata mantenuta costantemente a 1/10 circa di atmosfera, ricorrendo all'espediente indicato a pag. 635, cioè mantenendo sempre pieno il bottiglione dell'acqua. La temperatura di questa fu pure costante, di 27° C. circa; tale era la tempera-

(1) I bacilli della dissenteria da me adoperati provenivano da quelli isolati dal Dr. Bajardi dalle feci di un dissenterico, durante una piccola epidemia di dissenteria nell'Alto Cadore.

tura che nel mese di giugno si aveva nella stanza dei termostati, cosicchè in questa esperienza non fu necessario ricorrere alla fiammella per portare a detta temperatura l'acqua contenuta nel filtro. Ogni due, tre o quattro giorni aggiungevo un'emulsione in acqua di un'ansa di una coltura in agar di 18 ore circa di bacilli della dissenteria; tale aggiunta fu ripetuta per 14 volte nel corso dell'esperienza, che durò 31 giorni. Nelle ultime 4 volte, invece di aggiungere delle emulsioni in acqua di bacilli della dissenteria, aggiunsi delle colture freschissime in brodo, e ciò allo scopo di ripetere con questo bacillo le esperienze già fatte dallo Schoefer per il bacillo del tifo. Anche qui, oltre alle solite colture piane in gelatina a 23°-24° C., che dovevano servire per determinare il numero e la specie dei germi contenuti nell'acqua filtrata, ho istituito delle colture piane in agar a 38°-39° C., dopo essermi accertato che a tale temperatura i bacilli della dissenteria da me adoperati si sviluppavano rapidamente e rigogliosamente.

I risultati delle ricerche batteriologiche eseguite con le colture piane in gelatina a 23° sono riassunti nella tabella 10ª e sono già stati oggetto di discussione. Quanto ai risultati delle colture piane in agar a 38°-39° essi sono stati identici o quasi a quelli per il tifo: le capsule sono rimaste sempre perfettamente sterili e persistevano tali anche se venivano portate alla temperatura ambiente (22°-23° C.) dopo un giorno e ½ soltanto di esposizione a 38°-39°. Anche in questo caso dunque i batteri dell'acqua dell'acquedotto Nicolay che passavano traverso al filtro non si moltiplicavano a 38°-39°, ma anzi erano presto uccisi da tale temperatura.

Anche i bacilli della dissenteria dunque, dopo un mese e più di filtrazione continua in condizioni ordinarie di filtrazione, non sono stati capaci di traversare le pareti di una candela Malliè.

***

Volli allora vedere se riuscissero ad attraversarle aggiungendo all'acqua filtrante delle brodocolture freschissime (di otto ore circa) di bacilli della dissenteria, tali che pur contenendo un numero sterminato di bacilli presentassero ancora una quantità rilevante di materiale nutritizio. Per quanto ripetessi tale aggiunta per ben quattro volte (vedi tab. 10ª), ad intervalli di due o tre giorni, non riuscii mai a constatare nell'acqua filtrata un solo bacillo della dissenteria.

Sorpreso da tale fatto, in contraddizione coi risultati ottenuti da Schöfer (v. pag. 632), volli ripetere l'esperienza con un filtro rigenerato e sterilizzato; prima di collegar questo col solito bottiglione pieno di acqua Nicolay, nell'intercapedine fra la candela ed il manicotto metallico versai una brodocoltura di 8 ore circa di bacilli della dissenteria.

Dopo due giorni di funzionamento a pressione inferiore a $^1/_{10}$ di atmosfera (la lentezza della filtrazione impediva che il brodo venisse fortemente diluito e portato via rapidamente insieme con l'acqua filtrata), raccolsi due goccie di acqua filtrata in una capsula Petri, versai dell'agar e portai a 38°-39°; dopo 14 ore di esposizione a tale temperatura, notai la presenza di numerose coloniette iridescenti, di cui quelle superficiali apparvero più tardi più espanse, con tutti i caratteri delle colonie superficiali su agar di bacilli della dissenteria; l'esame microscopico in goccia pendente e in un preparato colorato confermò trattarsi di colonie di bacilli della dissenteria, le quali apparivano in coltura pura, o perchè altri germi acquatili non erano ancora passati con l'acqua filtrata o perchè non si erano potuti sviluppare alla temperatura di 38°-39°.

Ne conclusi che nella precedente esperienza i bacilli della dissenteria non erano riusciti ad attraversare la candela, perchè il loro passaggio era stato meccanicamente ostacolato dal fatto che la candela funzionava da molto tempo e che da molto tempo lasciava passare alcuni germi acquatili, i quali dovevano avere riempito e ostruito tutti i pori-canali della parete filtrante, impedendo così l'accesso ad altri germi.

Benchè quindi nelle condizioni ordinarie di filtrazione i germi patogeni (bacilli del tifo e della dissenteria, vibrioni del colera) non riescano mai a passare traverso a una candela Mallié, se all'acqua filtrante si aggiunge del brodo, essi riescono ad attraversare la candela se questa non funziona da molto tempo. Sotto questo aspetto quindi sarebbe da consigliarsi di lasciare funzionare a lungo le candele filtranti, senza mai rigenerarle, tanto più che abbiam visto che dopo un certo tempo i germi che passano con l'acqua filtrata diminuiscono di numero; in pratica però ciò non si può sempre effettuare a causa del bassissimo rendimento della candela stessa (1).

---

(1) Se però la pressione dell'acqua filtrante è piuttosto alta, il rendimento si conserva abbastanza elevato anche dopo molto tempo di funzionamento. Nel filtro impiantato nel laboratorio, e nel quale la pressione è di 1 atmosfera, dopo parecchi mesi di funzionamento continuo, il rendimento è di tre litri circa al giorno.

Conclusioni (1).

1. L'espediente di immergere in una soluzione di acido acetico al 10 % le candele usate, espediente consigliato dall'Abba per rinnovare il loro potere filtrante, è pericoloso nella pratica famigliare, per l'acetato di rame che può passare nell'acqua filtrata. Nella ripulitura sotto un getto d'acqua e successiva bollitura in acqua, le candele Mallié si consumano molto meno di quelle Berkefeld e anche di quelle Chamberland; esse si possono inoltre sterilizzare con tutta facilità nella stufa a secco a 170° C., senza pericolo delle più piccole screpolature. Infine, a differenza delle candele Berkefeld, Chamberland e Ginori, esse appaiono di una costituzione più omogenea e più costante.

2. Un dato importantissimo nell'esame batteriologico dell'acqua filtrata è la temperatura alla quale si devono esporre le colture; non si può stabilire per tutti i casi quale sia la temperatura migliore; generalmente però sarà da preferirsi quella di 20°-25° C. Non si ricorra mai, meno che in casi speciali, alla temperatura di 37° C., perchè a tale temperatura alcuni batteri acquatili non solo non si sviluppano, ma dopo 1-2 giorni restano uccisi; può così accadere che un'acqua filtrata ricchissima di germi, nelle colture a 35°-40° C. appaia completamente sterile come è occorso a me nella filtrazione dell'acqua del Gorzente, dell'acquedotto Nicolay e in parte anche dell'acquedotto civico. Non è da consigliarsi, in linea generale, l'uso del brodo; non essendo possibile evitare sempre un inquinamento dall'esterno, si potrebbe giudicare inquinata un'acqua filtrata che invece è ancora sterile.

3. Il criterio per giudicare che una o più colonie sviluppatesi in colture piane derivano da germi realmente presenti nell'acqua filtrata è quello non solo del numero abbondante di tali colonie, ma anche e sopratutto della unicità della specie batterica delle colonie stesse e del fatto se queste colonie appaiono più numerose negli esami successivi.

4. Quanto più la temperatura alla quale ha luogo la filtrazione è vicina a quella *optimum* per lo sviluppo delle specie batteriche contenute nell'acqua filtrante e in essa capaci di moltiplicarsi, tanto più presto i germi passano nell'acqua filtrata e tanto più rapidamente va crescendo di giorno in giorno il loro numero; questo può così raggiungere delle cifre veramente colossali, mille e più volte più grandi di

(1) I risultati da me ottenuti e quindi le conclusioni che ne deduco si riferiscono ai filtri Mallié; naturalmente però la maggior parte di tali conclusioni possono estendersi anche agli altri filtri dello stesso tipo (Chamberland, Berkefeld ecc.).

quelle del quantitativo batterico dell'acqua da filtrare. Dopo un certo tempo però, raggiunto un limite massimo, il numero dei germi contenuti nell'acqua filtrata diminuisce fortemente; ciò almeno è occorso a me nelle filtrazioni a temperature piuttosto alte (tab. 10ª).

5. Se si vuole che il filtro dia sempre acqua sterile, bisognerà pulire la candela sotto un getto d'acqua e bollirla in acqua, ogni sette od otto giorni se la temperatura non supera i 12°-13° C., ogni due o tre giorni se arriva ai 25° C. ed oltre.

6. La rapidità del passaggio dei germi traverso al filtro dipende anche dalla qualità dell'acqua filtrante e cioè tanto dalla sua composizione fisico-chimica, quanto dalla sua flora batterica e siccome questa può variare anche in una stessa acqua potabile, si capisce come a epoche diverse si possano ottenere risultati diversi, indipendentemente dalle variazioni di temperatura ecc.; i risultati da me ottenuti e le conclusioni che ne deduco si riferiscono quindi alle acque da me adoperate; naturalmente però una parte di tali conclusioni si può estendere anche a tutte le altre acque.

7. I germi contenuti nelle acque da me filtrate appartenevano dapprima a una sola specie, poi a 2, 3, 4, 5 e perfino 6 specie (tab. 4ª); non è escluso che con altre acque possa passare un numero ancor più grande di specie, e come con altre (acqua di Torino, Abba), anche dopo qualche mese di filtrazione, non passino che una o due specie soltanto. Tale numero del resto può variare col variare non solo della flora batterica dell'acqua filtrante, ma anche della temperatura alla quale ha luogo la filtrazione. Così con le tre acque da me adoperate, quando la temperatura era piuttosto alta (28°-30°), il numero di specie trovate nell'acqua filtrata fu sempre di due anche dopo molti giorni di filtrazione.

8. Non è sempre vero che i germi mobili passino traverso al filtro prima di quelli immobili; la precedenza nel passaggio dipende dalla maggiore rapidità di sviluppo a quella data temperatura e forse anche dal maggior numero dei batteri presenti nell'acqua da filtrare.

9. I bacilli del tifo e della dissenteria e i vibrioni del colera nelle condizioni *ordinarie* (senza aggiunta di brodo all'acqua filtrante) di filtrazione dell'acqua dell'acquedotto De Ferrari-Galliera, Nicolay e civico non sono passati mai traverso al filtro; le esperienze sono state proseguite per un mese nel caso dei vibrioni del colera e dei bacilli della dissenteria e per mezzo mese nel caso dei bacilli del tifo.

10. Per mantenersi nelle condizioni naturali di filtrazione bisogna adoperare l'acqua come essa si trova in natura, cioè non privata del suo contenuto batterico, nè con la filtrazione sterile (che tratterrebbe

anche le particelle sospese), nè con la ebollizione che altererebbe la costituzione fisico-chimica dell'acqua. Inoltre nell'acqua da filtrare i batteri patogeni in esame vanno aggiunti non in grande quantità tutti in una volta, ma poco alla volta ripetutamente tutti i giorni, od ogni due o tre giorni, giacchè in questo modo ci avviciniamo di più al modo con cui l'inquinamento di un'acqua potabile può avvenire in natura. Infine vanno aggiunte non colture in brodo, ma emulsioni in acqua di colture su agar, prive di qualsiasi traccia di materiale nutritivo.

11. Per mettere i germi patogeni aggiunti all'acqua da filtrare nelle condizioni più favorevoli al loro possibile sviluppo ed eventuale passaggio traverso al filtro, non bisogna agginngerli quando già la candela funziona da molto tempo, ma fin dal principio della filtrazione; bisogna inoltre mantenere l'acqua del filtro ad una temperatura elevata, vicina alla temperatura *optimum* di sviluppo dei batteri patogeni in esame.

12. Nelle mie esperienze coi bacilli del tifo e della dissenteria e coi vibrioni del colera aggiunti all'acqua da filtrare, per scoprire nell'acqua filtrata questi batteri patogeni in essa eventualmente contenutl (ricerca ostacolata dalla presenza nell'acqua stessa di una quantità enorme di altri batteri acquatili), ho ricorso a un espediente semplicissimo che mi ha permesso di dimostrare con tutta facilità e sicurezza l'assenza dei suddetti germi patogeni nell'acqua filtrata. Questo espediente consiste nel fare con 1-2 cmc. di acqua filtrata le colture piane su agar a 38°-40° C. Nelle mie esperienze delle tabelle 8ª, 9ª e 10ª fatte con le tre acque dell' acquedotto DeFerrari-Falliera, Nicolay e civico, cui avevo aggiunto i bacilli del tifo e della dissenteria e i vibrioni del colera, mentre le capsule di gelatina o di agar, inquinate con quantità minime di acqua filtrata (fino ad $^{1}/_{10000}$ di cmc.) e mantenute a 20°-24° C., contenevano numerose colonie di batteri acquatili, quelle di agar inquinate con 1 cmc. di acqua filtrata e mantenute a 38°-40° C., apparivano completamente sterili; orbene in queste capsule non riscontrai mai una sola colonia di tifo, o di colera, o di dissenteria.

13. Colonie di questi germi patogeni si svilupparono invece nelle capsule d'agar, mantenute anch'esse a 38°-40°, e inquinate con $^{1}/_{10}$ di cmc. dell'acqua endocontenuta nel filtro e prelevata 1, 2, 3 giorni dopo l'immissione (nel filtro stesso) della emulsione dei suddetti batteri patogeni. Tali colonie comparvero generalmente dopo 10-12 ore e ad esse si aggiunsero, dopo 1-2 giorni di esposizione delle capsule a 38°-40°, altre colonie di altri batteri contenuti nell'acqua; il ritardato sviluppo di queste non ostacolò dunque affatto il riconoscimento delle colonie di tifo, colera e dissenteria.

Infine nell'ultima esperienza coi bacilli della dissenteria (aggiunta di brodo all'acqua filtrante), nelle capsule d'agar a 39°-40°, seminate con acqua filtrata, le colonie di questi germi comparvero e si mantennero in coltura pura.

14. In nessuno degli autori da me consultati ho trovato suggerito il metodo da me sopra indicato e che pure è tanto semplice e tanto facile. Non resta, è vero, esclusa la probabilità che con alcune acque contenenti dei germi capaci di moltiplicarsi a 40° C. e passati anch'essi nell'acqua filtrata, questo metodo non riesca così vantaggioso come nel caso delle acque da me esaminate; ad ogni modo esso avrà sempre il vantaggio di impedire o di ritardare lo sviluppo, se non di tutte, di alcune delle specie batteriche acquatili presenti nell'acqua filtrata.

15. Nell'acqua contenuta nell'intercapedine tra il manicotto metallico e la candela, i bacilli del tifo e i vibrioni del colera sono stati da me riscontrati vivi, gli uni dopo due giorni almeno, gli altri dopo tre giorni almeno dalla immissione, nell'acqua stessa, delle emulsioni di colture di tifo o di colera.

16. Aggiungendo all'acqua filtrante delle brodocolture freschissime (di otto ore ci ca) di bacilli della dissenteria, questi non furono da me riscontrati nell'acqua filtrata la prima volta in cui vennero aggiunti quando la candela funzionava già da molto tempo, furono invece riscontrati e anzi numerosi e in coltura pura la seconda volta in cui vennero aggiunti in una candela di fresco pulita e rigenerata.

Serie 1ª di esperienze. *Acqua del Gorzente. Filtro collegato al rubinetto della condottura per mezzo di un tubo di gomma. Pressione quasi ²/₃ di atmosfera. Filtrazione interrotta. Acqua molto torbida.*

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
				Tabella I.				
1	15 sett. 1904 ore 9	21	1,200	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro nuovo e sterilizzato a 160°C. per un'ora.
2	15 » » 12	21	1,100	0	0	0	0	
3	16 » » 9	21	900	0	0	0	0	Fra il n. 3 e il n. 4, due giornate di interruzione per mancanza d'acqua.
4	18 » » 10	21.5	700	74	8	66	3	
5	19 » » 9	20	600	200	200	0	1	
6	20 » » 10	19	550	560	560	0	1	
7	21 » » 10	19	520	1,100	1,100	0	1	
				Tabella II.				
1	26 sett. 1904 ore 16	19	1,100	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro nuovo, sterilizzato a 160°.
2	27 » » 12	19.5	900	0	0	0	0	Fra il n. 2 e il n. 3, due giornate di interruzione per mancanza d'acqua.
3	30 » » 12	19.5	700	85	15	70	3	
4	1 ottobre 1904 ore 10	19.5	620	190	190	0	1	
5	2 » » 10	19	560	540	540	0	1	
6	3 » » 12	20	510	1,200	1,200	0	1	

TABELLA III.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	5 ottobre 1904 ore 15	19	1,100	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro nuovo, sterilizzato a 160° C. per un'ora.
2	6 » » 10	18.5	900	0	0	0	0	
3	7 » » 14	19	750	1	1	0	1	
4	8 » » 18	18	650	0	0	0	0	
5	9 » » 18	17	550	0	0	0	0	Tra il n. 5 e il n. 6, qualche ora di interruzione per mancanza d'acqua.
6	10 » » 18	16	500	70	70	0	1	
7	11 » » 17	16	460	290	290	0	1	
8	12 » » 11	16.5	420	760	760	0	1	
9	13 » » 12	17	400	1,450	1,100	350	2	
10	14 » » 12	17	500	2,690	1,600	1,090	2	Aperto di più il rubinetto e quindi aumentato il rendimento.
11	15 » » 12	17.5	450	4,500	2,700	1,800	3	
12	16 » » 10	17	400	3,500	1,700	1,800	3	
13	17 » » 11	17	360	6,400	3,000	3,400	3	
14	18 » » 11	17	330	7,100	3,500	3,600	4	
15	19 » » 11	16	300	non contate	non contate	non contate	4 ?	
16	21 » » 12	16.5	280	»	»	»	5 ?	
17	25 » » 9	15.5	250	»	»	»	5 ?	

Serie 2ª di esperienze. *Acqua del Gorzente. Filtro innestato direttamente alla condottura dell'acqua. Pressione poco più di 1 atmosfera. Filtrazione continua. Acqua meno torbida della serie precedente.*

TABELLA IV.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	25 ottobre 1904 ore 11	16	1,500	..	..	..	..	Comincia la filtrazione con un filtro nuovo e sterilizzato.
2	26 » » 14	16.5	1,300	0	0	0	0	
3	27 » » 15	16	1,100	0	0	0	0	
4	28 » » 10	15.5	1,000	1	0	1	1	
5	29 » » 18	15	900	0	0	0	0	
6	31 » » 9	14.5	800	0	0	0	0	
7	1 novem. 1904 » 11	15	850	45	45	0	1	
8	2 » » 18	14.5	800	140	95	45	2	
9	4 » » 9	14	740	230	170	60	2	
10	5 » » 17	14.5	710	390	260	130	2	

Segue TABELLA IV.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	*Osservazioni*
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
11	7 novem. 1904 ore 11	15	670	730	580	150	3	
12	8 » » 16	14.5	650	1,350	1.150	200	3	
13	10 » » 9	14	620	2,400	1,950	550	3	
14	11 » » 17	14.5	600	..	..	..	..	
15	13 » » 9	14	570	..	..	..	..	
16	14 » » 14	14.5	550	10,400	8,600	1,800	3	A cominciare dal n. 16, in ogni capsula Petri è stato seminato soltanto $^1/_{120}$ di cmc.; il numero di colonie sviluppatesi in ogni capsula dal n. 16 al n. 21 è stato da 95 a 180.
17	16 » » 9	14	525	14,400	9,600	4,800	4	
18	17 » » 14	14	510	12,000	8,400	3,600	4	
19	19 « » 9	13.5	475	20,400	7,200	13,200	4	
20	20 » » 16	14	460	21,600	7,200	14,400	5	
21	22 » » 9	13.5	430	18,600	9,600	9,000	6	

TABELLA V.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	23 marzo 1905 ore 11	?	1,100	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro che ha già funzionato molto tempo, che è stato immerso per qualche giorno nella soluzione al 10% di acido acetico e poi sterilizzato a 170° per un'ora.
2	24 » » 11	11	950	0	0	0	0	
3	25 » » 10	11	870	1	0	1	1	
4	26 » » 10	11	800	0	0	0	0	
5	27 » » 12	12	750	0	0	0	0	
6	28 » » 12	12	720	0	0	0	0	
7	29 » » 11	12	700	2	1	1	2	
8	30 » » 12	12 5	680	0	0	0	0	
9	31 » » 10	12.5	660	0	0	0	0	
10	1 aprile 1905 ore 12	13	650	0	0	0	0	
11	2 » » 18	12.5	630	35	35	0	1	
12	4 » » 9	12	600	56	56	0	1	

Serie 3ª di esperienze. *Acqua dell'Acquedotto Civico. Filtro collegato al rubinetto della condottura per mezzo di un tubo di gomma. Pressione bassa. Filtrazione continua. Acqua limpida.*

TABELLA VI.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	10 marzo 1905 ore 16	7. 2–10. 8	600	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro nuovo, sterilizzato a 170° per un'ora.
2	10 » » 17	7.2-10.8	600	1	1	0	1	
3	11 » » 11	9. 8-13. 2	500	0	0	0	0	
4	12 » » 10	8. 2-13. 3	450	2	1	1	2	
5	13 » » 14	?	420	0	0	0	0	
6	14 » » 18	7. 6–11. 8	390	3	2	1	3	
7	15 » » 17	9. 2-13. 6	370	0	0	0	0	
8	16 » » 16	8. 6–13. 5	350	1	0	1	1	
9	17 » » 19	10–13. 3	330	35	0	35	1	
10	19 » » 9		300	170	60	110	2	
11	20 » » 10		290	310	110	200	2	
12	21 » » 10		280	500	200	300	2	

TABELLA VII.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	25 marzo 1904 ore 11	?	500	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro usato, immerso per qualche giorno nella soluzione acetica e poi sterilizzato a 170° per un'ora.
2	26 » » 10	9.4-14	450	0	0	0	0	
3	27 » » 9	11.8-15 3	400	0	0	0	0	
4	28 » » 10	10.2-14 8	350	0	0	0	0	
5	29 » » 11	11 -16.5	320	0	0	0	0	
6	30 » » 11	10.2-16.2	280	25	0	25	1	
7	31 » » 10	12 -15.6	260	140	0	140	1	
8	1 aprile 1904 » 10	11 -15.4	240	300	0	300	1	
9	2 » » 12	?	230	550	120	430	2	

Serie 4ª di esperienze. *Acqua del Gorzente. Filtro collegato a un bottiglione pieno d'acqua, per mezzo di un tubo di gomma e di un sifone. Pressione da 1/10 a 1/14 di atmosfera. Filtrazione continua. Acqua poco torbida.*

TABELLA VIII.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc, all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	15 aprile 1904 ore 9	28	40	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro già usato, immerso per qualche giorno nella soluzione acetica e poi sterilizzato a 170° per un'ora.
2	16 » » 9	»	28	0	0	0	0	
3	17 » » 9	»	26	320	0	320	1	Prima di iniziare la filtrazione si versa nella intercapedine, fra il manicotto e la candela, una emulsione in acqua di bacilli del tifo vivi (v. pag. 657).
4	18 » » 9	»	24	2,670	400	2,270	2	
5	19 » » 9	»	22	..	..	..	..	
6	20 » » 9	»	20	..	..	..	..	A cominciare dal n. 6, le cifre relative al contenuto batterico dell'acqua filtrata sono approssimative; la conta è stata fatta nelle capsule in gelatina dopo un giorno solo di incubazione a 22°, a causa del rapido sviluppo delle colonie fluidificanti la gelatina.
7	21 » » 9	»	19	..	..	..	..	
8	22 » » 9	»	18	386,000	72,000	314,000	2	
9	23 » » 9	»	17	475,000	86,000	389,000	2	
10	24 » » 9	»	16	528,000	81,000	447,000	2	Si aggiunge una nuova emulsione in acqua di bacilli del tifo.
11	25 » » 9	»	15 1/4	485,000	76,000	409,000	2	
12	26 » » 9	»	14 1/2	648,000	72,000	576,000	2	Id.
13	27 » » 9	»	14	594,000	84,000	510,000	2	
14	28 » » 9	»	13	526,000	84,000	442,000	2	Id.
15	29 » » 9	»	13 1/2	..	..	..	..	

Tabella IX.

Serie 5ª di esperienze. *Acqua dell'Acquedotto Civico, limpidissima. Filtro collegato a un bottiglione pieno d'acqua, per mezzo di un tubo di gomma e di un sifone. Pressione da $^1/_{10}$ a $^1/_{14}$ di atmosfera. Filtrazione continua.*

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	*Osservazioni*
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	3 maggio 1905 ore 9	30	38	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro già usato, immerso per qualche giorno nella soluzione acetica e poi sterilizzato a 170° per un'ora. Prima di iniziare la filtrazione, si versa nella intercapedine, fra il manicotto e la candela, un'emulsione in acqua di un'ansa di agarcoltura di vibrioni del colera vivi (coltura di 18 ore).
2	4 » » 9	30	26	0	0	0	0	
3	5 » » 9	30	23 $^1/_2$	..	..	..	..	
4	6 » » 9	30	21	470	470	0	1	Si aggiunge un'altra emulsione in acqua di un'ansa di agarcoltura di vibrioni del colera vivi (coltura di 18 ore).
5	7 » » 9	30	19	830	830	0	1	
6	8 » » 9	30	17 $^1/_2$	750	750	0	1	Id.

Segue TABELLA IX.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
7	9 maggio 1905 ore 9	30	16	2,300	1,800	500	2	
8	10 » » »	30	15	2,100	1,750	350	2	Si aggiunge un'altra emulsione in acqua di un'ansa di agarcoltura di vibrioni del colera vivi (coltura di 18 ore).
9	11 » » »	30	14	7,500	5,600	1,900	2	
10	12 » » »	30	14	8,600	6,200	2,400	2	Id.
11	13 » » »	30	13 1/2	8,500	6,000	2,500	2	
12	14 » » »	30	13 1/4	15,000	11,400	3,600	2	Id.
13	15 » » »	30	13	19,000	12,000	7,000	2	
14	16 » » »	30	13	30,000	21,000	9,000	2	
15	17 » » »	30	12 1/2	28,000	20,000	8,000	2	Id.
16	18 » » »	30	12	..	..	..	..	
17	19 » » »	30	12	..	..	..	..	

Segue TABELLA IX.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
18	20 maggio 1905 ore 9	30	$11 \frac{1}{2}$	115,000	75,000	40,000	2	Si aggiunge un'altra emulsione in acqua di un'ansa di agarcoltura di vibrioni del colera vivi (coltura di 18 ore).
19	21 » » »	30	11	165,000	100,000	65,000	2	Si riempie di nuovo il bottiglione di acqua dell'Acquedotto Civico e così la pressione torna a $\frac{1}{10}$ di atmosfera.
20	22 » » »	30	22	200,000 ?	110,000	90,000 ?	2	
21	23 » » »	30	18	315,000 ?	215,000	100,000 ?	2	
22	24 » » »	30	17	256,000	144,000	112,000	2	
23	25 » » »	30	$16 \frac{1}{4}$	376,000	170,000	206,000	2	Si aggiunge un'altra emulsione di vibrioni del colera vivi (coltura di 18 ore).
24	30 » » »	30	14	..	..	..	..	Id.
25	31 » » »	30	$13 \frac{1}{2}$	480,000	265,000	215,000	2	Id
26	1 giugno 1905 ore 9	30	14	445,000	200,000	245,000	2	
27	2 » » »	30	13	..	..	..	..	

Serie 6ª di esperienze. *Acqua dell'acquedotto Nicolay, limpidissima. Pressione costante di $^{1}/_{10}$ di atmosfera. Filtrazione continua.*

TABELLA X.

Num. d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
1	2 giugno 1905 ore 15	27	42	..	..	..	..	Comincia la filtrazione traverso a un filtro già usato, immerso per qualche giorno nella soluzione acetica e poi sterilizzato a 170° per un'ora. Nel filtro si versa un'emulsione in acqua di un'ansa di agarcoltura di 18 ore di bacilli della dissenteria.
2	3 » » 9	»	28	0	0	0	0	
3	4 » » 9	»	26	144	0	144	1	Id.
4	5 » » 9	»	25	1,740	390	1,350	2	Un'ansa il 6 giugno e un'altra il 7.
5	10 » » 17	»	22 $^{1}/_{2}$	56,400	13,200	43,200	2	Un'ansa l'11 giugno e un'altra il 12.
6	17 » » 17	»	20 $^{1}/_{2}$	255,200	49,200	206,000	2	Un'ansa il 18 giugno.
7	19 » » 9	»	19 $^{3}/_{4}$	354,000	60,000	294,000	2	
8	20 » » 9	»	20	540,000	120,000	420,000	2	Un'ansa.
9	21 » » 9	»	19 $^{1}/_{2}$	252,000	36,000	216,000	2	

Segue TABELLA X.

Num: d'ordine	Data	Temperatura acqua filtrante — Centigradi	Rendimento (in cmc., all'ora)	Numero dei germi in 1 cmc. dell'acqua filtrata			Specie batteriche	Osservazioni
				Totale	Liquefacenti	Non liquefacenti		
10	22 giugno 1905 ore 9	27	19	..	..	..	..	Un'ansa.
11	23 » » 9	»	19 1/4	122,000	24,000	98,000	2	
12	24 » » 9	»	19	? 84,000	? 24,000	? 60,000	2	
13	25 » » 9	»	19	20,800	3,780	16,500	2	Id.
14	26 » » 9	»	19	15,960	1,140	14,820	2	Nel filtro si versano 10 cmc. di una brodocoltura di bacilli della dissenteria di 10 ore.
15	27 » » 9	»	18 1/4	12,960	1,200	11,760	2	
16	28 » » 9	»	18 1/2	12,480	1,440	11.040	2	Id.
17	29 » » 9	»	18 3/4	..	..	..	..	Id.
18	30 » » 9	»	18 3/4	..	..	..	..	
19	1 luglio 1905 ore 9	»	18 1/2	8,640	1,080	7,560	2	Id.
20	2 » » 9	»	19 1/4	..	..	..	..	
21	3 » » 9	»	19	..	..	..	..	

TABELLA XI *(Supplemento alla tabella III).*

Numero d'ordine	Acqua filtrata		Acqua del manicotto		Acqua della condottura		Osservazioni
	Germi in 1 cmc.	Specie batteriche	Germi in 1 cmc.	Specie batteriche	Germi in 1 cmc.	Specie batteriche	
1	.	..	..	..	450	11	I numeri d'ordine corrispondono a quelli della tabella 3ª.
5	0	0	4,200	7	520	8	
11	4,500	3	non contate	?	350	9	
12	3,500	3	15,000	5	600	9	Dell'acqua del manicotto ho seminato $^1/_{500}$ di cmc. e contate rispettivamente 30 e 50 colonie.
17	non contate	5	25,000	7	460	10	

BIBLIOGRAFIA.

I. Abba, *La filtrazione domestica delle acque potabili*. Ingegneria Sanitaria, 1905.

II. Acosta e Grande Rossi, *El filtro Chamberland*. Crònica médico-quirurgica de la Habana, 1892, n. 18. Vedi anche Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XII, pag. 883 (1892).

III. Bitter, *Die Filtration bakterientrüber und eiweisshaltiger Flüssigkeiten durch Kieselguhrfilter*. Zeitschrift für Hygiene, Vol. X, pag. 155 (1891).

IV. Bujwid, *Ueber verschiedene Arten der Wasserfiltration*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XVI, pag. 118 (1894).

V. Cambier, Comptes-rendus, 1901, pag. 1442.

VI. Dege, *Trinkwasserreinigung mit besonderer Berücksichtigung der militärischen Verhältnisse*. Inaug.-Dissert., Kiel, 1903. Vedi anche Hygienische Rundschau, Vol. XV, pag. 299 (1905).

VII. Dserschgowski, *Untersuchung der neuen Berkefeld'schen Hausfilter*. Wratsch., 1893, n. 9. Vedi anche Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XVI, pag. 118 (1894).

VIII. Esmarch, *Ueber Wasserfiltration durch Steinfilter*. Ibidem, Vol. XI, pag. 525 (1892).

IX. Esmarch, *Ueber kleinste Bakterien und das Durchwachsen von Filtern*. Ibidem, Vol. XXXII Origin., pag. 561 (1902).

X. Frendenreich, *Ueber Durchlässigkeit der Chamberland'schen Filter für Bakterien*. Ibidem, Vol. XII, pag. 240 (1892).

XI. Freudenreich, *Bemerkungen zu Dr. Kübler's Referat, etc.* Hygienische Rundschau, Vol. III, pag. 10 (1893).

XII. Gedy, Gesundheits-Ingenieur, 1890, n. 6.

XIII. Giltay e Aberson, *Methode zur Prüfung von Filtereinrichtungen wie die Chamberland-Bougies*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª. Vol. XII, pag. 92 (1892).

XIV. Gorham, *Filtre imperméable aux germes*, Bulletin de l'Institut Pasteur, Vol. III, pag. 278 (1905).

XV. Gruber, *Gesichtspunkte für die Prüfung und Beurteilung von Wasserfiltern*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XIV, pag. 488 (1893).

XV-*bis*. Gruber, *Antwort von Herrn Dr. Kirchner, etc.* Ibidem, Vol. XV pag. 165 (1894).

XVI. Haan (de) e Straub, *Voordrachten over bacteriologie voor praktizeerende medici en veeartsen*. Leiden, 1895. Vedi anche Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XVIII, pag. 463 (1895).

XVII. Kirchner, *Grundriss der Militärgesundheitspflege*. Braunschweig, 1892, pag. 162.

XVIII. Kirchner, *Untersuchungen ueber die Brauchbarkeit der Berkefeld-filter, etc.* Zeitschrift für Hygiene, Vol. XIV, pag. 299, e Volume XV, pag. 179 (1893).

XIX. Kirchner, *Gesichtspunkte für die Prüfung und Beurteilung von Wasserfiltern*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XIV, pag. 516 (1893).

XX. Köttstorfer, *Versuche ueber die Wirksamkeit des Berkefeld-Filter*. Zeitschrift für Wahrungsmittel-Unters. Hygiene, Volume IX, n. 8. Vedi anche Hygienische Rundschau, Vol. V, pag. 741.

XXI. Kübler, *Untersuchungen ueber die Brauchbarkeit der « filtres sans pression, Système Chamberland-Pasteur »*. Zeitschrift für Hygiene, Vol. VIII, pag. 48 (1890).

XXII. Kübler, *Erwiderung, etc.* Hygienische Rundschau, Vol. III, pag. 11 (1893).

XXIII. Jolin, *Einige Untersuchungen ueber die Leistungsfähigkeit der Kieselguhrfilter* (tradotto da Kirchner). Zeitschrift für Hygiene, Vol XVII, pag. 517 (1894).

XXIV. Lacour, *Récherches chimiques et bactériologiques sur les boues des filtres Chamberland*. Revue d'hygiène, Vol. XIV, n. 6.

XXV. Lübbert, Pharmaceutische Centralhalle, 1891, nn. 39 e 40.

XXVI. Lunt, *The sterilisation of water by filtration*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XXIII, pag. 795 (1898).

XXVII. Main, Journal d'agriculture pratique, 7 febbraio 1901. (Vedi Rivista d'Igiene, Vol. XII, pag. 863).

XXVIII. Miquel, Revue scientifique, 1885, 1° agosto.

XXIX. Miquel, *Manuel pratique d'analyse des eaux*. Paris, 1891, pag. 172.

XXX. Morgenroth e Bassenge, *Bericht ueber die in bakteriol. Laborat. zu Tientsin ausgeführten Arbeiten*. Deutsche militärärzlt. Zeitschrift, Vol. XXX, pag. 548 (1901). Vedi anche Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XXXI Referate, pag. 5.

XXXI. Nordtmeyer, *Ueber Wasserfiltration durch Filter aus gebrannter Infusorienerde*. Zeitschrift für Hygiene, Vol. X, pag. 145 (1891).

XXXII. Pelzl, *Die neuen Filtertypen auf der Pariser Weltausstellung 1900*. Der Militärärzlt., 1902, nn. 11-14. Vedi anche Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XXXII Referate, pag. 367.

XXXIII. Pfuhl, *Ergebnisse einer erneuten Prüfung einiger Kieselgur-und Porzellanfilter auf Keimdichtigkeit*. Festschrift zum 60. Geburtstage von R. Koch, Iena, 1903, pag. 75.

XXXIV. Prochnik, Transact. of the VII Internat. Congress of Hygiene and Demography II, pag. 301. London, 1902 (vedi in Schöfer, XXXV).

XXXV. Schöfer, *Ueber das Verhalten von pathogenen Keimen in Kleinfiltern*. Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XIV, pag. 685 (1893).

XXXVI. Schüder, *Die Wassersterilisation.* Gesundheits-Ingenieur, 1903, num. 16.

XXXVII. Smith e Moore, *Zur Prüfung der Pasteur-Chamberland-Filter.* Centralblatt für Bakteriologie, 1ª, Vol. XII, n. 18.

XXXVIII. Ströszner, *Einiges ueber die Wasserversorgung von Schulen nebst Bemerkungen ueber ein neues Wasserfilter.* Zeitschrift für Schulgesundheitspflege, 1901, pag. 456. Vedi anche Hygienische Rundschau, Vol. XII, pag. 745.

XXXIX. Vaillard, *L'épuration de l'eau potable en campagne.* Archives de médecine et de Pharmacie militaires, 1902, n. 7.

XL. Weyl, *Die Kieselguhrfilter als Hausfilter.* Berliner klinische Wochenschrift, 1892, n. 23.

XLI. Wherry, *Experiments on the permeability of the Berkefeld filter and the Pasteur-Chamberland bougie to bacteria of small size.* The Journal of medical research, Vol. VIII, pag. 322 (1902).

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI CAGLIARI

Contributo alla conoscenza dello stipite Actynomices albus

Actynomices albus var. tossica

per **CARMELITA ROSSI**, dottoressa in Scienze Naturali.

E' noto come un certo numero di batteri si sia venuto individualizzando in un gruppo ben determinato di forme: il gruppo degli *Actynomices* o *Streptothrix*, i quali per la presenza di ife fertili, aeree, asciutte, per la formazione di spore terminali, per la sepimentazione dei filamenti sporigeni, giustamente il Gasperini (1) riportò agli Ifomiceti.

Questo gruppo racchiude oramai un grande numero di forme e si va giornalmente arricchendo di altre, perchè molte delle già note e descritte come batteri, si dimostrano essere delle streptotricee.

Infatti, si pongono già nel gruppo in discorso alcuni dei più noti germi patogeni già descritti come batteri o bacilli, che presentano in adatti terreni di coltura il tipico sviluppo degli *Actynomices*.

Per fare alcuni esempi, il bacillo della tubercolosi, il bacillo della difterite, quello della morva ed oramai tutta la congerie dei pseudotubercolari, dei pseudodifterici, dei pseudomorvosi e, secondo alcuni, forse il bacillo della peste sarebbero delle *Streptotrix*.

Del resto, a considerare bene le descrizioni che sono state date di molti altri germi, è logico almeno sospettare che varie siano le streptotricee che ancora si trovano descritte come tipici batteri. Lo studio che sul riguardo è stato fatto dal Bajardi (2) sui vibrioni descritti dal Webel e precisamente sul *vibrio lingualis* non lascia dubbio che persino delle

(1) Soc. tosc. di sc. natur., 1891-1895. Annales de micrographie, 1890. Annali d'igiene, 1892, ecc.
(2) *Die Streptotrix lingualis in Munde der Gesunden und der Diphterischen.* Centr. f. Bakt., I Abt. Originale, Bd. XXXV.

forme state descritte come vibrioni debbano farsi rientrare nel gruppo delle streptotricee (1).

Quanto ai batteri propriamente detti, basterà ricordi che il *b. Zopfii*, per esempio, in date condizioni può presentare degli aspetti che potrebbero riferirsi ad una streptoticea, come ha veduto il Casagrandi (2) e che in vita libera esiste un germe, l'*Actynomyces Zopfii* dello stesso autore, descritto dal Biagi (3) che ha i caratteri del *b. Zopfii* coltivato su blocchetti di caolino imbevuto di soluzioni minerali nutritive.

Ciò premesso, dirò subito che ho avuta l'opportunità di studiare una forma di streptotricea la quale dapprima si presentò nelle colture come una tipica batteriacea, e poi assunse i caratteri di una streptotrix che ho trovato capace di produrre una sostanza tossica nelle sue spore. Riferisco nel presente lavoro i risultati delle ricerche fatte su di essa.

I.

Caratteri anatomo-patologici del tumore da cui fu isolata la streptotricea.

Il materiale di cui potei disporre era rappresentato da due tumori del cavo addominale di due polli, sezionati in epoche diverse e gentilmente fornitimi dal prof. O. Casagrandi.

Al primo pezzo era annessa la seguente descrizione, che per quanto incompleta riporto:

« Tumore del cavo addominale di un pollo occupante 2/3 di esso, di consistenza molto dura, di aspetto lardaceo, con superficie di taglio continua, bianco-sporca, granulosa.

« Raschiata la superficie e fattone dei preparati colorati con il liquido di Ziehl si trovano forme a bastoncino della lunghezza presso a poco eguale a quella del bacillo della tubercolosi nello sputo, leggermente curve, quali colorantesi uniformemente e quali a tratti. Le colture di questo materiale in agar glicerinato, nel brodo di Loeffler diedero sviluppo ad un batterio corto e tozzo resistente al Gram, il quale nei passaggi in brodo pur conservando la forma di bastoncino mostrava delle forme a clava che ricordavano quelle del b. della difterite.

Al secondo pezzo era unita quest'altra descrizione:

(1) Credo si possa ritenere che anche altri batteri descritti come vibrioni, quali il *v. nasalis*, una forma di *v. tyrogenes* e forse anche una di *v. Milleri* presentino caratteri propri degli streptotrix.

(2) *Sulle relazioni tra batteri proto, meta, paratrofi.* Questi Annali, Roma, 1901-1903.

(3) *Contributo alla conoscenza del genere actynomyces.* Lo Sperimentale, luglio-agosto 1904.

« Tumore identico al precedente, ma di un volume superiore, circa 1/3 di più. Non fu fatto l'esame microscopico diretto del tumore, furono però fatte delle colture. Il materiale per gli innesti venne tratto dalla raschiatura della superficie di taglio del tumore ed innestato in agar solidificato a becco di flauto. Si ebbe così sviluppo di una patina densa, molliccia, poco estesa, abbastanza aderente al substrato di nutrizione, di un colorito bianco-sporco, qua e là interrotta, che all'esame microscopico si mostrava costituita di un batterio piuttosto lungo e spesso omogeneamente colorabile, resistente molto bene al metodo del Gram, immobile (fig. 1ª).

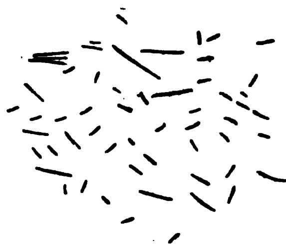


Fig 1.

« Nel brodo si notò, senza intorbidamento del liquido di nutrizione, la formazione di un deposito poltaceo, denso, costituito da masse di batteri come i sopra descritti, forse un pochino più corti.

« Lasciando invecchiare le colture, le patine sull'agar assunsero un aspetto accartocciato, diventarono più secche, maggiormente aderenti al substrato di nutrizione e cosparse qua e là come da una fine polvere bianca. In quelle in brodo aderenti alla parete del vetro e verso il fondo si notò la formazione di qualche fiocco che non agitando il tubo rimaneva sospeso nel liquido. Esaminando al microscopio la patina sviluppatasi sull'agar ed esaminando le colture in brodo si osservarono forme batteriacee ramificate che misero in chiaro la natura di *Actynomices* o *Streptothrix* del germe coltivato (1) ».

Caratteri macro e microscopici del tumore. — Rilevai questi caratteri dal tumore del secondo caso che potei avere a mia disposizione. Il tumore ha il volume di un piccolo arancio, è di forma ovoidale, ha

---

(1) A questi due casi posso aggiungere notizia di un terzo che però è andato completamente perduto. Si sarebbe trattato di tumori della grandezza di una moneta di rame da 10 centesimi, quindi schiacciati, di aspetto nummulare, aderenti alla sierosa di tutto il tratto dell'intestino crasso di un pollo, in numero di circa 5 o 6, dell'identico aspetto e consistenza di quelli osservati negli altri due casi: dalla raschiatura della superficie di taglio di uno di essi, fatti dei preparati colorati col metodo del Gram, sarebbe risultata la possibilità di mettere in evidenza delle forme battericho ramificate (ad ipsilon) e clavate.

superficie liscia, regolare, lucida, è di consistenza dura. La superficie del taglio si presenta di aspetto omogeneo, consistente, qua e là come fibrosa. Nelle zone esterne, però, offre maggiore compattezza, apparendo come limitato da una capsula esile non distaccabile. Nelle parti centrali si notano piccoli spazi cavitari di forma e calibro regolari, per lo più racchiusi entro un tessuto più friabile del resto, quasi areolare. In questa zona esistono pure come dei piccoli cumuli di una sostanza giallastra, compatta, che zaffa piccole cavità circoscritte, dalle quali si possono anche distaccare.

Tutta la massa trabecolata poi è alquanto spappolabile e il contorno di questa zona non è netto ma sfuma nei segmenti circostanti fondendosi con essi in modo intimo.

Il tessuto principale è costituito da grossi elementi a nucleo bene individualizzato, qualche volta in cariocinesi, spesso vescicolare, ben distinto nelle varie parti, con protoplasma ampio di forma irregolare. Queste cellule sono distribuite in modo atipico come nei tessuti sarcomatosi puri a tipo globo e fuso cellulare misto. Pochi di questi elementi offrono forme degenerative.

Quasi tutti trovansi quindi in condizioni di vitalità spiccata. Esistono qua e là delle cellule che potrebbero dirsi giganti, quasi sempre mononucleate e qualche volta plurinucleate con protoplasma molto ampio. Un tenue connettivo fibrillare più o meno lasso è interposto tra gli elementi, e notasi pure la presenza di fibre elastiche in certi punti, addossati in cumuli. I vasi sanguigni di vario calibro serpeggiano nella massa: quelli di medio calibro sono ben distinti in tutte le loro tuniche. I capillari sono appena apprezzabili, privi di emazie, mentre ne contengono i vasi di grosso calibro. Verso la parte esterna del tumore, il tessuto connettivo aumenta così da fare delle vere travate che includono degli elementi disposti in fila. Dapertutto poi notasi infiltrazione leucocitaria di diverso grado.

Gli stessi leucociti formano in certi punti degli ammassi ed in altri si unisce ad essi un fine detrito amorfo. Alla periferia del cespuglio actinomicotico esiste un notevole infiltrato di leucociti che talvolta raggiunge uno spessore considerevole, formando come un vero nodulo infiammatorio plastico attorno al cespuglio stesso. All'esterno di essi e specialmente dove il nodulo actinomicotico è più piccolo notasi un cercine radiato di elementi non diversi da quelli prima descritti nel contesto del tumore: spesse volte una capsula di tenue connettivo abbraccia tutto il nodulo.

Reperto batteriologico. — Già dall'esame istologico del tumore nelle sezioni colorate coll'ematossilina è facile scorgere qua e là dei cespugli

actinomicotici, i quali assumono nella loro parte più periferica, e quindi nella raggera delle clave, la colorazione violetta oscura propria dell'ematossilina. Colorando poi col metodo del Gram la presenza dei cespugli actinomicotici (fig. 2ª) diviene evidentissima.



Fig. 2.

Questi cespugli actinomicotici sono assai caratteristici, di varia grandezza, sparsi qua e là nel tumore, alcuni con la tipica forma a rosetta descritta dagli autori, altri in ammassi irregolari e più o meno grandi, risultanti dalla riunione di cespugli più piccoli. Caratteristica è specialmente la presenza di numerose clave periferiche, quali più lunghe, quali più corte a contenuto indifferenziato, circondanti a raggera la massa cespugliosa. Meno caratteristico è il contenuto del cespuglio dacchè non è facile scorgerlo costituito da filamenti ramificati più o meno intrecciantisi tra loro se non nelle parti meno centrali e soltanto nei cespugli più piccoli: di solito il nucleo del cespuglio si mostra costituito da una massa granulare mal definibile, che mal prende il colore violetto e che è logico ritenere derivi dalla distruzione del nucleo miceliare del cespuglio. Soltanto in qualche caso nel nucleo del cespuglio si nota la presenza di qualche elemento bastonciniforme che si colora come le clave periferiche, ricordante la forma di una batteriacea propriamente detta.

II.

Caratteri morfologici e biologici della streptotrix.

Stando alla descrizione che era stata data del germe appena fu isolato e alla figura annessa alla descrizione, non pareva trattarsi di una strepotricea. Atteso poi il fatto che nei cespugli actinomicotici venne trovata, mediante l'esame microscopico di preparati colorati, la presenza di tipiche forme a bastoncino, si potrebbe anche credere che il

primo sviluppo nelle colture fosse derivato da queste ultime forme, le quali avrebbero riprodotto delle batteriacee tipiche.

Faccio subito notare che molte streptotrix, in primo tempo si sono presentate sotto questo aspetto.

Anche di recente il bacillo della pseudo-tuberoolosi che dalla Rabinovitsch (1) e poi successivamente da una serie di autori anche italiani è stato dimostrato essere diffuso nel latte e nel burro, il Lombardo Pellegrino (2) lo ha collocato nel gruppo delle streptotricee albe. Aggiungo ancora che basta leggere qualcuna delle descrizioni dei batteri trovati in focolai della così detta pseudo-tubercolosi per persuadersi della possibilità di osservare sotto forma bacillare pura e semplice dei veri e propri actinomiceti.

Del resto sono stati descritti veri e propri casi di actinomicosi i cui cespugli contenevano vere forme batteriacee. Il Sanfelice (3) per es., studiando 8 casi di actinomicosi epatica, trovò 2 noduli di *Actynomices* completi con le loro clave alla periferia, ed altri non delimitati da tessuto fibroso, con forme bacillari. E quel che più importa si è che l'A. notò che le colture di *Actynomices* si ottenevano dai noduli a contenuto bacillare e non da quelli a contenuto clavato.

Prescindendo quindi dai caratteri che il germe presentò nelle prime colture, riferisco senz'altro quelli che ho rilevati nei trapianti successivi, dove aveva assunto la forma definitiva di una streptotricea.

Caratteri microscopici.

In preparati da colture in brodo di 3 giorni, filamenti lunghissimi, divisi dicotomicamente (fig. 3ª), quà e là con qualche spazio chiaro.

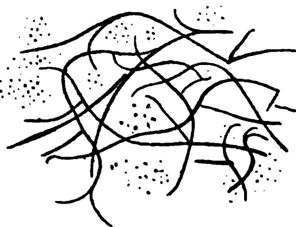


Fig. 3.

(1) Zeitschr. f. Hyg., vol. 26, pag. 90.

(2) *Sul comportamento delle streptotricee e di alcuni batteri nei grassi.* Questi Annali, 1904.

(3) *Beiträge zur Kenntniss d. Actinomikose der Leber bei den Rindern.* Arch. f. wissensch. u. prakt. Thierheilk. 1896.

Questi filamenti colorati col metodo del Gram assumono intensamente il colore violetto. In preparati da colture in agar, vecchi di qualche mese si nota la formazione di elementi rotondi (v. la stessa figura), fortemente rifrangenti la luce, dotati di un forte movimento browniano. Essi costituiscono la estremità delle ife fertili aeree e sono le spore terminali o gonidî. Colorati col metodo Gram al pari dei filamenti mostrano di resistere alla colorazione in modo tipico.

Caratteri colturali.

In gelatina a piatto. — Colonie rotondeggianti, cespugliose, giallo-sporche, a bordi sfrangiati, e visti al microscopio appaiono filamentoso-raggiati, a contenuto fortemente granuloso.

Attorno a ciascuna colonia la fluidificazione della gelatina si rende bene visibile, dopo la 1ª settimana di sviluppo; però è certamente iniziata dopo 4 giorni dallo innesto, la gelatina circostante alla colonia apparendo più limpida.

In agar a piatto. — Colonie più grandi di una testa di spillo, bianco-sporche, aderenti al terreno di nutrizione, perfettamente sferiche, a bordi finemente areolati, più chiari rispetto al contenuto che è più denso, non trasparenti. Ad un certo ingrandimento appaiono grossolanamente granulose, a contenuto giallo-bruno, non trasparenti, senza nucleo ben delimitato. I bordi si presentano finemente raggiati ed i raggi mostrano una netta ramificazione.

Su agar solidificato a becco di clarino. — Patina biancastra spessa, densa, a superficie ondulata da principio e poi accartocciata a carta geografica, aderentissima al substrato di nutrizione.

Invecchiando la coltura si ricopre come di una polvere bianco-nivea, non facilmente amovibile, che aderisce all'ago di platino solo quando è bagnato.

Su fette di patate alla Esmarch si sviluppa con le stesse modalità, presentando gli stessi caratteri osservati sull'agar.

In gelatina per infissione sviluppo nastriforme lungo la linea di innesto, denso, spesso, qua e là con qualche leggera protuberanza clavica. Sviluppo in superficie di una patina spessa, densa, bianca opaca a contorno irregolare qua e là continuantesi in una colonia a nucleo spesso ed opaco ed a bordi trasparenti come finemente vellutati. Questa patina dopo i primi 4 giorni incomincia ad affondarsi nel substrato di nutrizione nel quale si scava una specie di fossa a coppa sul cui fondo si depone mentre la gelatina sovrastante si mostra fluidificata e limpida.

La prima serie di ricerche sortì esito completamente negativo: reputo quindi inutile riferirle con dettaglio.

Quanto alla seconda mi fu possibile assodare che le sospensioni dei conidî in acqua distillata, purchè provenienti da colture molto vecchie, inoculate in grande quantità nel sottocutaneo e nel peritoneo dei conigli producevano leggeri tremori che duravano persino 4-5 ore.

Allora nell'idea di produrre una grande quantità di patina seminai molte fette di patate e di carote con conidî di vecchie colture in agar.

Le fette di patate si ponevano in scatole di Petri scoperte, sospese su appositi sostegni, entro camere di Tyndall con al fondo bicloruro di mercurio all'1 ‰ in modo che l'ambiente rimanesse sufficientemente umido.

Quando tutte le patine che si erano sviluppate sulle fette di patate e di carote assumevano un aspetto bianco-farinoso, si toglievano le capsule dalle camere di Tyndall e coprendole col relativo coperchio sterile, si mettevano direttamente in termostato ove si lasciavano per un tempo più o meno lungo e in genere sino a che il substrato cominciava a seccarsi.

Con le patine raccolte mediante un robusto raschino, si fecero estratti acquosi ed alcoolici.

Gli estratti acquosi a 80° concentrati in piccolo volume, inoculati nel sottocutaneo di due conigli, produssero abbattimento con leggeri tremori generali e dopo 5 ore la morte del primo coniglio, dopo 3 ½ la morte del secondo. Non insistei però ulteriormente a studiarne l'azione, perchè il residuo dell'estrazione con alcool che subito dopo sperimentai, emulsionato in acqua, si mostrò dotato, allorchè lo inoculai nei conigli, di maggiore azione tossica; il coniglio inoculato con esso morì infatti in 4 ore presentando assai più evidenti i tremori per tutto il corpo.

Fermai perciò senz'altro la mia attenzione sull'estratto alcoolico dei conidî.

Ora ecco quanto potei mettere in evidenza nel residuo della estrazione alcoolica delle patine sporificate della streptotrix. Questo estratto conteneva una sostanza pochissimo solubile nell'acqua, solubilissima nell'alcool, nel cloroformio e nell'etere: essa non si decomponeva alla temperatura di ebollizione dell'acqua, trattata con percloruro ferrico reagiva con una colorazione verde cupo, non distillava in corrente di vapore acqueo e non colorava in verde il reattivo usato dal Di Pietro. Parmi dunque che se si tratta di una sostanza fenolica, anche fondandoci su questi soli dati, non è certo quella messa in evidenza nel penicillo glauco del mais dal Gosio e dal Di Pietro.

Va da sè che per mezzo di ricerche di confronto ho potuto nella maniera più completa escludere che questa sostanza si trovasse nei terreni di nutrizione.

Estratto così il veleno l'esperimentai sugli animali per la via sottocutanea, per la via endoperitoneale, per quella endovenosa e per quella gastrica. Espongo i risultati nei seguenti quadri:

Numero	Specie dell'animale	Estratto inoculato corrispondente a patina umida	Via di inoculazione	Risultato
1	Coniglio	1 gr.	Sottocute	Morto dopo 12 ore. Edema sottocutaneo di colorito giallo scuro; fegato molle, iperemico; vescica con urina torbida, rossastra; intestino ripieno di liquido mucoso, giallastro; sangue liquido, grumi nel cuore destro.
2	Id.	0. 20 id.	Id.	Sopravvive.
3	Id.	0. 20 id.	Id.	Sopravvive.
4	Id.	0. 25 id.	Id.	Sopravvive.
5	Cavia	0. 60 id.	Id.	Convulsioni clonico-toniche: muore dopo 20 ore.
6	Id.	0. 20-0. 70 id.	Id.	Soli tremori che spariscono in 4-5 ore.
7	Id.	0. 02 id.	Id.	Niente che fermi l'attenzione.
8	Cane	5 id.	Gastrica	Vomito dopo 10 minuti, che continua per 1 ora a intervalli; leggeri tremori; il cane si rimette.
9	Id.	1 id.	Id.	Vomito.
10	Id.	1 id.	Id.	Vomito.
11	Id.	1 id.	Id.	Vomito (qualche lieve tremore).
12	Id.	0. 50 id.	Peritoneo	Vomito (qualche lieve tremore).
13	Id.	0. 50 id.	Id.	Vomito (qualche lieve tremore).
14	Id.	0. 50 id.	Id.	Vomito (qualche lieve tremore).
15	Topo	0. 05 id.	Endovenosa	Muore quasi istantaneamente con tremori.
16	Id.	2 id.	Gastrica	Muore dopo 14 ore; tremori prima e poi paresi.
17	Id.	1 id.	Id.	Muore dopo 18 ore. All'autopsia fegato molle, flaccido; reni piccoli; iperemici; polmone iperemico; vescica con urina torbida rossastra.

IV.

Confronti con altre streptotricee.

Assodati così i caratteri morfologici e biologici della *Streptothrix*, mi proposi di paragonarli con quelli delle altre streptotricee albe note per vedere se fosse stato possibile identificarla con qualcuna di esse.

A volere però eseguire il lavoro in modo da trarre delle conclusioni esatte sarebbe stato necessario possedere le descrizioni particolareggiate morfologiche e biologiche delle varie streptotricee albe o almeno di quelle isolate da affezioni analoghe di polli o di altri animali.

Per quanto però abbia consultato la letteratura, non mi è riuscito di trovare altri casi simili di actinomicosi nei polli, mentre invece se ne trovano descritti nei cavalli, nelle capre, nelle pecore, nei maiali e persino nelle cavie e nei conigli. Anche nell'uomo i casi di actinomicosi sono stati descritti ed oramai sono abbastanza numerosi. Senonchè le descrizioni date di queste varie streptotrix dai diversi autori sono per la massima parte così monche che spesso è impossibile istituire paragoni concludenti.

In ogni caso è certo che nessuno parla di una streptothrix *le cui efflorescenze inoculate negli animali abbiano prodotto fenomeni tossici.*

Prescindendo ad ogni modo da questo fatto, ho voluto paragonare i caratteri della *streptotrix* da me studiata con quelli indicati per alcune streptotricee albe dal Biagi (1), dacchè essi risultavano ricavati secondo lo stesso indirizzo di studio cioè per la *Zopfii*, per l'*alba di Berestenew*, per l'*alba II*, per la *Queensland*, per la *Madurae*. Trovai così che tutt'al più essa poteva avere una certa relazione con l'*Actynomices albus di Berestenew* isolato dai prodotti patologici provenienti dalla sezione di una inferma affetta da actinomicosi polmonare con tipo cavitario ed infiltrante, nonchè da focolai multipli al cervello ed alla cute della stessa natura.

Mancavano però nella streptotricea da me studiata, alcuni dei caratteri della *Streptothrix di Berestenew*. Per citarne uno che mi pare molto importante, non ho mai osservato nelle colture in brodo filamenti con « ramificazioni laterali o terminali nettamente a forma ovoide » ricordanti in tutto e per tutto la forma di clave e ciò nonostante che i

(1) Loco citato.

cespugli actinomicotici ritrovati nel tumore fossero ricchissimi di forme clavate.

Servendomi poi della prova sierodiagnostica ho voluto vedere se vi erano delle relazioni tra la *Streptothrix* da me studiata e l'*alba* che comunemente si isola dall'aria e che risponde ai caratteri dapprima indicati dal Forster e studiati dal Gasperini (1) e dal Rossi Doria (2) nonchè con l'*Actynomices bovis*.

Cercai perciò per rendere possibile la prova di ottenere delle colture omogenee, la forma caratteristica a cespuglio dell'*actynomices* non essendo adatta allo scopo.

Tentai di omogeneizzare le brodoculture col metodo dello sbattimento indicato dall'Arloing per ottenere intorbidate le colture in brodo del bacillo della tubercolosi.

Ad analogo procedimento era ricorso il Biagi per ottenere le colture intorbidate delle varie streptotricee da lui studiate. Essendomi però stato impossibile ridurre con lo stesso procedimento omogenee le colture della *Streptothrix* per quanto seguissi in tutti i dettagli la tecnica dell'Arloing, pensai di fare la prova sierodiagnostica sui conidî.

A tal uopo raschiai mediante una robusta ansa di platino, appena inumidita in brodo sterile, una certa quantità della superficie polverosa di colture vecchie su agar, e la emulsionai in brodo sterile per un tempo più o meno lungo, sino a che esaminando gli strati superiori del liquido trovai all'esame microscopico i conidî in massima bene separati l'uno dall'altro. Su queste emulsioni di conidî, feci agire allora il siero di cani inoculati ripetutamente con una *streptotrix alba* isolata da un'acqua e con due *actinomyces bovis*, nei rapporti di 1 di siero a 25. 50, 100, 250 dell'emulsione.

La prova è stata fatta tanto in gocce pendenti quanto in piccoli tubi i quali venivano posti in termostato a 37° ed osservati a intervalli di tempo da 1 a 12 ore. Naturalmente si fecero i debiti controlli con siero di cane sano.

Dalla prova macroscopica potei ricavare dei dati poco utili: nei rapporti bassi 1:25 — 1:50 in quasi tutti i tubi si ebbe un deposito copioso di conidî. Dalla prova microscopica risultò che dopo 6 ore si andavano formando ammassi i quali divenivano più o meno numerosi nelle prove col siero del cane inoculato con la *Streptothrix alba*; il fenomeno però si iniziava già dopo un'ora con la cessazione del movimento browniano dei conidî.

Nonostante questi risultati non ho però creduto possibile identificare la streptotricea da me studiata con quella con cui fu inoculato

(1) Loco citato.
(2) *Alcune specie di* streptotrix *trovate nell'aria*. Questi Annali, 1892.

il cane. Ricorderò del resto che anche il Biagi col siero di animali inoculati con la *Streptothrix* di Berestenew agglutinava anche un'altra *Streptothrix alba* isolata da un'acqua, la quale era indubbiamente differente da quella di Berestenew.

Ho anche voluto vedere se la *Streptothrix* da me studiata potesse aver rapporti con quella di recente descritta dal De Bernardinis (1) e che l'A. trovò capace di produrre ulcere corneali. L'ho quindi inoculata nei conigli in tasche endocorneali fatte secondo il metodo per le inoculazioni vacciniche. Nei punti inoculati dopo 48 ore si sono notati ispessimenti bianchi-opachi perfettamente delimitati nella cornea circostante rimasta del tutto limpida e trasparente.

Estirpati ad ogni modo gli occhi degli animali inoculati, e fatte sezioni delle cornee fissate in sublimato e colorate parte con ematossilina e parte con il metodo di Weigert, trovai nei punti innestati lo strato epiteliale distaccato dal sottostante connettivo, senza che nè questo, nè quello mostrassero alcuna nota istopatologica degna di rilievo: la cavità formatasi dal distacco dei due strati della cornea era parzialmente riempita di elementi rotondeggianti, parte dei quali prendevano il Gram e parte no: essi potevano riportarsi ai conidii della *Streptothrix* che era stata inoculata (fig. 4ª).

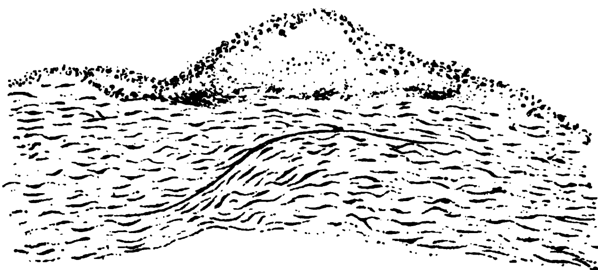


Fig. 4.

Stando così le cose non rimaneva che vedere se la *Streptothrix* da me isolata potesse trovar posto tra quelle di recente studiate dal Sanfelice (2). Questi infatti, avendo avuto l'opportunità di isolare dall'aria parecchie streptotricee, le ha riunite in diversi gruppi, il primo dei quali è rappresentato dalla *Streptothrix alba* o *Actynomices albus*.

(1) *Ulcera corneale da* streptotrix. Questi Annali, 1904.

(2) *Tubercolosi e pseudotubercolosi*, Rif. med., anno XX, n. 22. *Ueber die pathogene Wirkung einiger Streptotrix-Arten*. Centr. f. Bakt., I Abth. Orig., 1904.

I caratteri colturali generali di questa forma sono in realtà quelli stessi che presenta la *Streptothrix* da me studiata; però in realtà questa non poteva paragonarsi che a quella varietà *alba* che il Sanfelice isolò da un nodulo actinomicotico della lingua di un bue, dacchè, solo questa tra le albe mostrò di mantenere come la mia il colorito bianco nei trapianti successivi sulle patate.

Dal punto di vista dell'azione patogena, poi, dalle due streptotricee albe del Sanfelice dimostratesi patogene l'una verso i conigli, l'altra verso questi animali e le cavie, era facile differenziare la mia *Streptothrix*.

Basti dire che l'*alba II* produrrebbe lesioni pseudo-tubercolari nei polmoni e nei reni con presenza di batteri acidoresistenti, e che l'*alba I* uccide gli animali inoculati in vena, con una affezione nodulare, miliare, negli organi.

Conclusioni.

Le presenti ricerche mi hanno quindi condotto alle seguenti conclusioni:

1. Vi è una streptotricea del gruppo delle albe che si trova in certi granulomi dei polli dove produce il tipico cespuglio actinomicotico e da dove è isolabile sotto una forma di una batteriacea tipica: solo con l'invecchiare delle colture, assume i caratteri di una *Streptothrix*.

2. Mentre i prodotti solubili ricavati da colture in brodo sono del tutto atossici e gli estratti etereoalcoolici, nucleoproteidici, nucleinici, non hanno alcuna azione specifica, quelli delle colture sporificate sviluppatesi su patate e su carote si mostrano dotati di azione tossica verso i conigli, le cavie, i cani e i topi, qualunque sia la via che si sceglie per l'inoculazione.

3. Si può dimostrare che la sostanza tossica si forma soltanto nelle colture sporificate e che si contiene nelle spore.

4. Per il suo diportamento in rapporto alla solubilità nell'acqua, nell'alcool, nell'etere e per la reazione che dà col cloruro ferrico parrebbe esser una sostanza fenolica: in ogni caso non è identica a quella che è stata messa in evidenza nel penicillo glauco del mais pellagrogeno.

5. Non è possibile identificare questa streptotricea con alcuna delle albe note: potrebbe per alcuni caratteri colturali avvicinarsi o all'*Actinomyces albus I* di Berestenew descritto dal Biagi, come potrebbe per il modo di diportarsi di fronte alla prova siero-diagnostica

avvicinarsi alla comune *Streptothrix alba;* attesa però la proprietà che ha di produrre una sostanza tossica nelle spore, proprietà che non è stata finora trovata in alcuna streptotricea, conviene ritenerla differente da tutte le streptotricee finora conosciute.

Denomino quindi il germe da me studiato *Streptothrix alba var. tossica* o *Actynomyces albus var. tossica.*

Cagliari, 14 giugno 1905.

Istituto d'Igiene della R. Università di Padova

Sulla possibilità e frequenza d'infezione per mezzo delle mani dei tubercolosi

Ricerche sperimentali del dott. **ALBERTO GRAZIANI**, aiuto.

E' noto come la cute del corpo umano e per i suoi rapporti col mondo esterno e per la sua costituzione anatomica ed istologica si presenta necessariamente assai ricca di germi, e ciò specialmente in quelle parti che, per la loro conformazione, sono facili ricettacoli al raccogliersi dei detriti di essa, e sono inoltre meno accessibili alla pulizia.

Infatti, i molteplici studi sui microrganismi della pelle hanno condotto a concludere che assai ricca e svariata ne è la flora batterica e che a ciò contribuisce non solo il depositarsi dei germi sopra di essa, ma il loro moltiplicarvisi, in quanto che nei prodotti della desquamazione cutanea ed in talune secrezioni, essi trovano un eccellente substrato di coltura.

Il Bizzozero. studiando di preferenza i microrganismi del capo, dei piedi e della superficie interna delle coscie, aveva notato che essi abbondano là dove c'è sevo e sudore, e che essi si trovano nell'interno delle cellule epidermiche.

Il Bordoni Uffreduzzi, esaminando le parti pelose e la faccia interna e superiore della coscia e gli spazi interdigitali dei piedi, rinvenne una grande quantità di germi saprogeni; e dopo di lui il Maggiora, studiando i microfiti della pelle umana e specialmente del piede, concludeva che sulla pelle umana albergano costantemente microrganismi che si possono isolare anche dal suolo e dall'aria atmosferica.

I successivi lavori del Preindesberger, del Nikolscki, del Wigura, del Markoff, del Remlinger, non fecero che confermare le precedenti ricerche, portando però un largo contributo alla conoscenza delle diverse specie dei saprofiti che sulla cuta umana si possono rinvenire, conoscenza che prese ancor un maggior sviluppo qnando cominciarono a sorgere i nume-

rosi e diversi metodi di disinfezione delle mani in chirurgia; così che i diversi esperimentatori erano costretti, negli studi di controllo, a ricerche, per lo meno qnantitativamente, assai esatte.

Però se lo studio dei saprofiti della pelle può dirsi oggidì completo, non altrettanto lo è per i germi patogeni, mentre sarebbe ben interessante il conoscere se sulla nostra cute ne esistano e che avvenga di essi.

Infatti, dati i rapporti diretti ed indiretti che la cute del nostro corpo e specialmente le parti scoperte di essa hanno e tra di loro e col mondo esterno, è ovvio pensare che la presenza di germi patogeni sulla cute di un individuo costituisca un continuo pericolo per chi più o meno direttamente venga in rapporto con esso.

Il Bonträger, considerando la mano nei rapporti igienici, diceva: «Ogni stretta di mano, ogni scrittura, ogni lavoro, il mettere o levare i guanti, il toccare un vestito od un corpo qualsiasi, il cibo o le bevande, infine ogni mossa della mano significa uno scambio di batteri »; e maggiormente la presenza di germi patogeni sulla pelle diventa pericolosa, per la riconosciuta difficoltà di disinfezione che, data la sua struttura istologica, essa presenta; poichè gli sbocchi delle ghiandole sebacee e sudoripare servono di entrata ai germi, che penetrano poi nell'interno delle cellule, dove naturalmente i mezzi di disinfezione non possono raggiungerli.

Di qnesta difficoltà è prova il grandissimo numero di mezzi proposti, dei quali nessuno può dirsi raggiunga sempre ed in modo assoluto lo scopo.

Infatti, Fürbringer, Mikuliez, Doderlein, Paul e Sarvey, Reinike, Engels, Tarnier e moltissimi altri, vennero alla conclusione, che ben raramente si può raggiungere una completa disinfezione della cute non ostante l'impiego dei mezzi più energici, e che qualora pure fosse stata ottenuta, essa dura ben poco tempo, perchè facilmente si rendono superficiali i germi che si trovavano negli strati profondi della cute.

Ciò è assai importante, poichè nella pratica della vita anche le persone più pulite non ricorrono ordinariamente che a semplici saponate e successive abluzioni, in modo che, se sulla loro pelle esistevano dei germi patogeni, questi sono soltanto in parte allontanati o distrutti.

La ricerca di tali germi costituendo un argomento così importante doveva necessariamente attrarre l'attenzione degli studiosi; infatti il Bockhart trovava lo stafilococco piogeno aureo in persone affette da sicosi parassitaria ed impetigo; in seguito Nikolski e Markoff trovavano spesso i comuni piogeni, non mai però il bacillo di Eberth e di Koch;

Wigura, studiando le mani di 10 infermieri del riparto erisipelatosi, trovò lo streptococco di Fehleisen una volta soltanto; nelle mani di 9 infermieri del riparto tifosi trovò 6 volte il *bacillum coli*, e 1 volta il bacillo del tifo, e su 6 flemmonosi trovò 4 volte dei piogeni.

Il Bricter, che si occupò anch'esso specialmente dei germi delle mani, trovò il gonococco in quelle dei blenerragici, e il bacillo di Loeffler in quelle dei difterici.

***

Come risulta dalle ricerche fin qui riferite, la presenza dei germi patogeni sulla pelle umana e specialmente sulle mani, in casi speciali, può dirsi quindi esser messa fuori dubbio; siccome però secondo quanto molti ammettono per spiegare la relativa rarità delle infezioni delle ferite, e secondo quanto fu provato sperimentalmente dal Binaghi, la cute umana presenta un certo potere di distruzione o per lo meno di attenuazione dei germi, così sarebbe interessante sapere se i germi patogeni che arrivano sulla superficie del corpo umano, conservano o no, per quanto tempo ed in quali condizioni la loro virulenza. Inoltre, dato che la presenza di tali germi sulla cute costituisce un pericolo per l'individuo che li porta, essendo ormai sperimentalmente dimostrato da Manfredi, Simoncini, Machnoff ed altri che i microorganismi possono attraversare la cute sana, tanto che il Wild potè affermare che tutti i casi di tubercolosi cutanea sono dovuti ad inoculazioni locali; tale presenza però costituisce un continuo pericolo anche per chi con l'individuo infetto viene in diretto o mediato contatto. Tale pericolo venne studiato per molti mezzi indiretti di contagio, non mai però, che io mi sappia, venne sperimentalmente dimostrata la possibilità di infezione per mezzo del diretto contatto tra mano e mano. Si comprende facilmente quale importanza abbia questa cognizione nella profilassi delle malattie infettive; prima tra queste la tubercolosi e per la sua diffusione, e per la lunga durata della malattia, e per il fatto che coloro che ne sono affetti mantengono i loro rapporti sociali per molto tempo dopo il manifestarsi dei primi sintomi, al contrario di quanto avviene per gli ammalati di altre infezioni, i quali vengono generalmente più o meno presto e rigorosamente isolati; perchè spesso, per ragioni di galateo, si suole portare la mano innanzi alla bocca allorchè si tossisce; ed infine perchè il bacillo tubercolare è tra i germi patogeni uno dei più resistenti agli agenti naturali di disinfezione, come la luce e l'essiccamento.

Fin dal 1888 il Di Mattei aveva posto in evidenza, anchè mercè la prova dell'inoculazione negli animali, che il bacillo tubercolare si può

trovare nel sudore dei tisici, ed avendo sperimentalmente dimostrato che esso non proveniva dalle ghiandole sudoripare, concludeva che vi era capitato o con le particelle di espettorato che nella tosse di detti ammalati spesso ricadono sul loro petto, o per il fatto che col medesimo fazzoletto con il quale si puliscono la bocca o nel quale sputano, si asciugano poi il sudore distendendo così sulla loro cute un materiale infettivo. In seguito egli stesso ricercò con esito positivo il bacillo specifico nei baffi, negli oggetti comuni d'uso, e nel sudiciume delle unghie dei tisici. Però a queste ultime ricerche, quantunque, anche per ulteriori conferme di altri autori, sieno attendibili, si potrebbe per le odierne conoscenze dei bacilli acidofili, fare il carico di mancare della controprova consistente nella inoculazione sperimentale negli animali.

Più tardi il Nikolski, il Markoff, il Binaghi, in analoghe ricerche non rinvennero il bacillo di Koch sulla pelle e specialmente sulle mani di tubercolosi, mentre invece il Wigura, il Bricter ed il Baldwin giungevano a risultati opposti.

Per queste contraddizioni e per il fatto che non tutte le ricerche furono eseguite con tecnica rigorosa, o per esser state limitate ad un troppo ristretto numero di soggetti, o per essere state condotte con criteri troppo unilaterali, tale studio non poteva ritenersi esaurito; onde di buon grado accettai il consiglio datomi dal mio maestro, prof. A. Serafini, di estendere le ricerche alle mani di parecchi soggetti tubercolosi, proponendomi specialmente di studiare con quale frequenza vi si rinviene il bacillo di Koch; se esso vi conserva le sua virulenza, e specialmente se esso può trasmettersi con facilità da individuo ad individuo, mediante la semplice stretta di mano.

***

La prima parte delle mie ricerche ebbe quindi lo scopo di assicurarmi, mediante l'esame diretto e l'inoculazione negli animali, della presenza e virulenza del bacillo di Koch nel materiale proveniente dalle mani di individui tubercolosi.

Avendo avuto per gentile consenso del primario dott. D'Ancona, la possibilità di studiare gli ammalati del riparto tubercolosi del civico ospedale di Padova, prescelsi tra essi quelli che, trovandosi nelle migliori condizioni, si alzavano tutti i giorni da letto, e ciò allo scopo di avvicinarmi il più possibile alle condizioni degli ammalati che vivono in società.

La tecnica da me seguita in questa prima serie di esperienze fu la seguente. Dopo essermi accertato mediante esame microscopico che l'espettorato del soggetto da me prescelto conteneva bacilli tubercolari, con circa 150 cc. di acqua sterilizzata facevo accuratamente lavare le mani

dell'ammalato entro ad una scatola di Koch sterilizzata pur essa, mentre un servente vi teneva sopra il coperchio, affine di evitare che nel parlare o tossire goccioline di saliva contenenti i bacilli, venendo direttamente dall'individuo in esame. potessero alterare i risultati dell'esperienza. L'acqua di lavaggio così raccolta, veniva portata nei laboratori di questo Istituto e quivi passata in 4 provette e centrifugata. Nel fondo della provetta si raccoglieva un materiale bianchiccio, composto in gran parte di detriti epiteliali. Con una grossa ansa di platino raccoglievo questo materiale e lo inoculavo nel connettivo sottocutaneo della faccia interna della coscia sinistra di due cavie, dopo averne prelevato una piccola quantità per l'esame microscopico diretto.

Quando gli animali inoculati, venendo spontaneamente a morte, oppure uccisi, presentavano qualche lesione sospetta, mi assicuravo della natura di questa con preparati microscopici a secco per schiacciamento, e dei tessuti inclusi in paraffina e sezionati al microtomo, e spesso nei casi dubbi con nuove inoculazioni in altri animali.

Esaminai dapprima in tal modo otto soggetti, di cui quattro maschi e quattro femmine; e nella tabella I (v. in fine) sonò chiaramente esposti i risultati di questa prima ricerca.

Degli otto primi individui da me esaminati, quattro adunque presentavano il bacillo tubercolare sulle loro mani; la sua presenza venne rivelata in tre di essi anche dal semplice esame microscopico diretto e fu confermata dalla inoculazione negli animali, mentre nel quarto quest'ultimo mezzo soltanto diede indizio della presenza del bacillo di Koch.

In tutti quattro i casi questo era virulento tanto che potè riprodurre la malattia nelle cavie e causarne la morte.

***

A questa prima ricerca si poteva muovere l'obbiezione che i soggetti da me prescelti potevano non essere nelle condizioni di puliziá, in cui si trovano di solito gli ammalati che vivono in società; e che d'altra parte, data la facilità d'infettarsi dell'individuo tubercoloso, per il fatto di avere in se stesso la sorgente infettiva, ammesso pure che un potere battericida della cute esista, i germi che avevano cagionata la morte delle cavie potevano essere gli ultimi arrivati e non avere ancora risentita l'azione della cute.

Perciò scelti altri quattro soggetti dello stesso ospitale, ed accertatomi al solito che il loro espettorato conteneva i bacilli di Koch, feci lavare ad essi le mani in mia presenza con acqua e sapone, come si usa per la comune pulizia, dopo di che li feci custodire per 3 ore, affinchè o portando le mani alla bocca o toccando i fazzoletti od i

vestiti propri o gli altrui, od alri oggetti contaminati da germi, non avessero ad infettarsi nuovamente. Dopo di ciò, con la tecnica precedentemente esposta riguardo alla prima ricerca, passai alla raccolta del materiale dalle loro mani e alla inoculazione negli animali. I risultati sono esposti, in fine, nella tabella II.

Come si vede, in questo caso, tre sui quattro individui esaminati, non ostante si fossero fatte lavar loro le mani e si fosse tolta la possibilità di infettarsi successivamente, presentavano sulle loro mani, virulento, il germe della tubercolosi.

***

Ancora però mi si poteva far carico che tutti i soggetti in esame erano stati presi fra i degenti di un riparto tubercolosi, fuori quindi della vita sociale, in uno stadio avanzato della malattia, in un ambiente dove erano raccolte molteplici sorgenti di infezioni.

Volli perciò portare le mie ricerche sopra individui che fossero nella vita comune, in seno alle loro famiglie; e potei farlo mercè il gentile aiuto del dott. Randi, medico capo del Municipio di Padova, il quale mise anche a mia disposizione una persona pratica perchè mi accompagnasse a domicilio dei tubercolsi poveri sussidiati dal Comune.

Dovetti però limitare le mie ricerche soltanto a sei persone non ostante ne abbia visitate una quarantina, per il fatto che esse o erano assenti, o erano degenti a letto, il che riproduceva presso a poco il caso dei degenti all'ospitale, o erano attente ad occupazioni che per il loro stesso genere non permettevano le mie ricerche, come ad esempio quella del bucato, o finalmente non tossivano e non espettoravano, in modo che alla diagnosi mancava a me il controllo del loro escreato. La tecnica seguìta fu sempre la medesima e, in fine, nella tabella III compendio questa nuova ricerca.

Quattro volte su sei era adunque presente e virulento il bacillo tubercolare sulle mani degli individui da me esaminati, che pur vivevano nel seno delle loro famiglie.

***

Dopo tale risultato ritenni completa la prima serie di ricerche relative alla presenza e alla virulenza del germe, e passai a studiare se esso potesse trasmettersi da uomo a uomo, mediante la semplice stretta di mano.

A tale scopo, recatomi all'ospedale, dopo essermi al solito assicurato che lo sputo conteneva i bacilli di Koch, davo la mia mano accuratamente lavata, disinfettata e risciacquata, al soggetto, prescelto, nel modo e per il tempo di una comune stretta di mano. Dopo di ciò, sempre con la tecnica innanzi descritta, facevo la ricerca del bacillo tubercolare nella mia mano.

Esaminai così sei soggetti col risultato che riassumo, in fine, nella tabella IV.

Come si vede, dopo aver stretta la mano a sei individui tubercolosi, due volte soltanto potei accertare la presenza del bacillo tubercolare sulla mia mano, che a tale stretta aveva servito.

Feci due nuove prove dando ogni volta successivamente la mano a tutti i degenti del riparto, una dozzina circa, e ricercando alla fine della esperienza su di essa il bacillo di Koch, nel solito modo. Tutte due queste ricerche mi diedero, come si rileva, in fine, dalla tabella V, risultati positivi.

***

Complessivamente, adunque, furono 24 soggetti tubercolotici da me esaminati, e sulle mani di 13 di essi rinvenni direttamente o indirettamente il bacillo di Koch.

Dalle mie ricerche posso dunque concludere:

1° Il bacillo di Koch si trova frequentemente sulle mani degli ammalati di tubercolosi polmonare, i quali espettorano.

2° Quando vi si rinviene, esso può essere vivo e virulento.

3° Il bacillo tubercolare può con frequenza e facilità essere trasmesso dall'uomo malato al sano, mediante la semplice stretta di mano.

Da ciò appare chiaro come per quell'intimo e spesso prolungato contatto di due mani, che si avvera nella costumanza sociale della stretta di esse, possano diffondersi i microrganismi patogeni in genere e quelli della tubercolosi in ispecie. La qualcosa dovrebbe accrescere quel senso di ripugnanza e schifo che spesso vien destato da una mano sudata e viscida. Ed è da far voti che perciò, come già va sempre più combattuto e cessando l'uso convenzionale del bacio che non sia irresistibile bisogno d'una espressione di intimi e sinceri affetti, così venga combattuta e scompaia anche la inutile e di frequente non sincera costumanza sociale della stretta di mano, che oltre all'infezione spesso maschera un odio compresso.

E l'igiene deve sperare d'avere in ciò coadiutrice quella moda, dalla quale, se bene guidata, potrebbero derivare alla salute dell'uomo tanti vantaggi quanti danni invece spesso gliene vengono, come, per esempio, a causa di irrazionali forme di vestiti, di cattiva distribuzione degli ambienti della casa e di quell'arredamento di essi che spesso serve a toglierli il beneficio della luce e a conservarvi accumuli di polvere e microrganismi pericolosi.

TAVOLA I.

Materiale proveniente da	Esame microscopico diretto	Animale inoculato	Peso — Grammi	Data della inoculazione	Data della morte (+) od uccisione (++)	Peso — Grammi	Reperto necroscopico
P..... A....., anni 22, villica	+	Cavia	462	29 aprile 1903	(+) 3 novembre 1903	400	Tubercolosi localizzata ai gangli inguinali del lato ove venne praticato l'innesto.
			412	»	(+) 7 ottobre 1903	376	Tubercolosi diffusa.
M..... P....., anni 40, falegname	—	»	545	»	(++) 20 dicembre 1903	540	Tubercolosi localizzata ai gangli inguinali del lato ove venne praticato l'innesto.
			418	»	(++) 11 gennaio 1904	430	Negativo per la tubercolosi.
M..... V....., anni 38, fabbro	—	»	520	»	(+) 3 novembre 1903	480	Id.
			515	»	(++) 11 gennaio 1904	500	Id.
F..... E....., anni 26, villico	+	»	388	»	(+) 25 agosto 1903	280	Tubercolosi diffusa.
			645	»	(+) id.	427	Id.
G..... G....., anni 25, calzolaio	—	»	425	3 febbraio 1904	(+) 15 agosto 1904	—	Non sezionata per un equivoco del servente.
			422	»	(++) 22 aprile 1905	540	Negativo per la tubercolosi.
R..... A....., anni 30, barcaiuolo	—	»	490	»	(+) 3 settembre 1904	450	Id.
			385	»	(+) 24 gennaio 1905	450	Id.
A..... B....., anni 44, casalinga	+	»	380	»	(+) 25 aprile 1904	309	Tubercolosi diffusa.
			365	»	(+) 23 ottobre 1904	300	Id.
R..... G....., anni 65, casalinga	—	»	355	»	(+) 3 settembre 1904	300	Negativo per la tubercolosi.
			318	»	(++) 22 aprile 1905	518	Id.

TAVOLA II.

Materiale proveniente da	Esame microscopico diretto	Animale inoculato	Peso — Grammi	Data della inoculazione	Data della morte (+) od uccisione (++)	Peso — Grammi	Reperto necroscopico
G.... G...., anni 35, casalinga	—	Cavia	392	26 febbraio 1904	(+) 16 ottobre 1904	400	Negativo per la tubercolosi.
			442	»	(++) 22 aprile 1905)	420	Id.
M..... C...., anni 31, villica	—	»	400	»	(+) 5 marzo 1905	420	Id.
			455	»	(++) 22 apiile 1905	400	Tubercolosi localizzata ai gangli ed ulcera nel punto d'innesto.
G..... F....., anni 24, cameriere	+	»	480	»	(+) 27 gennaio 1905	350	Tubercolosi diffusa.
			500	«	(++) 22 aprile 1905)	400	Negativo per la tubercolosi.
B.... L...., anni 56, contadino	+	»	430	»	(-+) 16 maggio 1904)	320	Tubercolosi diffusa.
			520	»	(+) 3 ottobre 1904	400	Id.

TAVOLA III.

Materiale proveniente da	Esame microscopico diretto	Animale inoculato	Peso — Grammi	Data della inoculazione	Data della morte (+) od uccisione (++)	Peso — Grammi	Reperto necroscopico
C..... L....., anni 26, domestica	—	Cavia	320	26 luglio 1904	29 luglio 1904	300	Negativo per la tubercolosi.
			595	»	11 agosto 1904	580	Id.
B..... U....., anni 16, fabbro	+	»	337	»	30 luglio 1904	300	Id.
			347	»	20 agosto 1904	285	Tubercolosi diffusa.
M..... V....., anni 41, guardia	+	»	455	»	28 agosto 1904	350	Id.
			337	»	4 ottobre 1904	285	Id.
P..... A...., anni 9 ½.	—	»	360	28 luglio 1904	30 agosto 1904	340	Negativo per la tubercolosi.
			355	»	31 agosto 1904	275	Tubercolosi diffusa.
D..... C....., anni 50, casalinga	—	»	355	»	31 luglio 1904	345	Negativo per la tubercolosi.
			332	»	Id.	325	Id.
L..... E....., anni 45, levatrice	—	»	375	»	18 novembre 1904	325	Tubercolosi diffusa.
			288	»	23 gennaio 1905	252	Id.

TAVOLA IV.

Materiale proveniente da	Esame microscopico diretto	Animale inoculato	Peso — Grammi	Data della inoculazione	Data della morte (+) od uccisione (++)	Peso — Grammi	Reperto necroscopico
E..... N....., anni 22, villica	—	Cavia	415	10 marzo 1904	(+) 18 novem. 1904	425	Negativo per la tubercolosi.
			380	»	(+) 15 novem. 1904	340	Id.
L.... M....., anni 18, domestica	+	»	405	»	(+) 28 ottobre 1904	300	Tubercolosi localizzata ai gangli inguinali ed ulcera al punto d'innesto.
			355	»	(+) 10 gennaio 1905	350	Tubercolosi diffusa.
G...,.. A....., anni 35, casalinga	+	»	315	»	(+) 23 agosto 1904	270	Tubercolosi localizzata ai gangli inguinali ed ulcera nel punto d'innesto
			405	»	(+) 14 gennaio 1905	305	Tubercolosi diffusa.
C..... L....., anni 26, contadino	—	»	380	14 marzo 1904	(+) 27 settem. 1904	350	Negativo per la tubercolosi.
			355	»	(+) 20 agosto 1904	300	Id.
M..... A....., anni 26, bovaio	—	»	457	»	(++) 22 aprile 1905	460	Id.
			480	»	»	470	Id.
R..... U....., anni 20, calzolaio	—	»	370	»	»	420	Id.
			450	»	»	505	Id.

TAVOLA V.

	Esame microscopioc diretto	Animale inoculato	Peso — Grammi	Data della inoculazione	Data della morte (+) o della uccisione (+ +)	Peso — Grammi	Reperto necroscopico
I prova	—	Cavia	515	16 marzo 1904	(+) 30 gennaio 1905	450	Tubercolosi localizzata ai gangli inguinali del lato ove venne praticato l'innesto.
			330	»	(+) 21 febbraio 1905	300	Tubercolosi diffusa.
II prova.	+	»	590	6 maggio 1904	(+) 13 febbraio 1905	470	Tubercolosi localizzata e diffusa.
			627	»	(+) 15 agosto 1904	..	Non sezionata per un equivoco del servente.

BIBLIOGRAFIA.

BALDWIN. *Infection from the hands of tuberculous persons*. Philadelphia medical Journal, 1898; Revue d'Hygiène et de Police sanitaire, 1899.

BINAGHI. *Della disinfezione e del potere disinfettante della cute umana.* Policlinico (sezione chirurgica), 1897.

BIZZOZERO. *Ueber die Mikrophyten der normalen Oberhaut des Menschen.* Virchow Archiv, Bd. XCVIII.

BOCKHART. *Ueber die Aetiologie und Therapie der Impetigo, des Forunkels und der Sykosis*, Monatschrifte f. prakt. Dermatologie, 1887.

BORNTRAEGER. *Die Hand in hygienischer Beziehung.* Gesundheit, 1900. Hygienische Rundschau, Bd. X.

BORDONI UFFREDUZZI. *Ueber die biologischen Eigenschaften der normalen Hautmicrophyten.* Fortschritte der Medic., Vol. IV.

DI MATTEI. *Sulla trasmissibilità della tubercolosi per mezzo del sudore dei tisici.* Archivio per le scienze mediche, Vol. XII.

DI MATTEI. *Della presenza del bacillo tubercolare sulla superficie del corpo dei tisici.* Bollettino della R. Accademia medica di Roma. Anno XV, 1888-89.

DODERLEIN. *Da una rivista nel* Supplement zur Deutschen Vierteljahrschrift f. oeffentliche Gesundheitspflege. XXXIII. Jahrgang,

ENGELS. *Einige Haendedesinfectionsversuche nach vorheriger kunstlicher Infection der Haende mit Micrococcus tetragenus und Staphylococcus piogenes aureus.* Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. XXXIV.

FUERBRINGER. *Untersuchungen und Vorschriften ueber die Desinfection der Haende des Arztes, etc.* Wiesbaden, 1888.

FUERBRINGER. *Die neusten experimentellen Grundlagen der Haendedesinfection.* Hygienische Rundschau, Bd. VI.

FUERBRINGER. *Entwickelung und Stand der Haendedesinfection.* Hygienische Rundschau, Bd. X.

MAGGIORA. *Contributo allo studio dei microfiti della pelle umana normale e specialmente del piede.* Giornale della R. Società Italiana d'Igiene, Vol. XI.

MACHNOFF. *Zur Frage ueber den Durchgang von Bakterien durch die Haut beim Einreiben.* Russkaia Medicina, 1889; Cent. f. Bakt. Bd. VII.

MANFREDI. *I gangli linfatici nella difesa dell'organismo contro la tubercolosi.* Lavori dell'Istituto di Igiene della R. Università di Palermo. Vol: V. 1899-901.

MARKOFF. *Kwoprossu o Sagriasnemi mikroorganismami koschi bolnych.* Inaugural Dissertation. Petersburg 1894. Da una rivista nel Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. XX.

MIKULIEZ. *Die Desinfection der Haut und Haende mittelst Seifenspiritus.* Hygienische Rundschau, Bd. IX.

NALHAU BRICTER. *La stretta di mano propagatrice di malattie.* Medical Record 1897, e Giornale Medico del R. Esercito, 1898.

NIKOLSKI. *Materialen zur Lehre von der Beschmutzung der Haut von Kranken mit Bakterien.* Centralblatt f. Chirurgie, 1903.

PAUL E SARWEY. *Experimental Untersuchungen ueber Haendedesinfection.* Hygienische Rundschau, Bd. X.

PREINDERSBERGER. *Zur Kenntniss der Bakterien des Unternagelsraumes und zur Desinfection der Haende.* Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. X.

REINICKE. *Bakteriologische Untersuchungen ueber die Desinfection der Haende.* Centralblatt f. Gynaekologie, 1894,

REMLINGER. *Le microbe de la peau humaine.* Citato nel lavoro di Simoncini.

SIMONCINI. *Sul valore protettivo della cute rispetto ai microorganismi.* Annali d'Igiene sperimentale. Vol XIII.

SPECK. *Hygienische Haendedesinfection* Zeitschrift f. Hygiene, B. L.

TARNIER. *De la desinfection des mains.* Revue générale de clinique et thérapeutique, 1893.

WASMUTH. *Ueber Durchgaengigkeit der Haut für Mikroben.* Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. XII.

WIGURA. *Ueber Quantitat und Qualitat der Mikrobien auf der menschlichen Haut.* Wratsch, 1895. Citato nel lavoro di Simoncini.

WILD ROBERT. *Some of sources infection in cutaneous tuberculosis.* Brit. med. Journ. 1899; Revue d'Hygiène et Police Sanitaire, 1900.



